

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Chave pictórica interativa de Diptera Calliphoridae: uma ferramenta para estudos forenses

Bruno Miguel Trindade das Dores

Dissertação orientada por:

Prof. Doutora Maria Teresa Rebelo (DBA/FCUL)

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2016

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Biologia Humana e Ambiente.

Trabalho realizado no Laboratório de Entomologia (Departamento de Biologia Animal) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Nota prévia

As referências bibliográficas desta Dissertação de Mestrado foram formatadas de acordo com os padrões da revista *Journal of Insect Science*.

Todas as fotografias em microscopia ótica utilizadas são do autor, exceto aquelas que estão devidamente assinaladas.

Agradecimentos

Ao longo deste ano, várias pessoas contribuíram, de alguma forma, para que a concretização deste projeto pudesse ser possível.

Em primeiro lugar gostaria de deixar o meu agradecimento à minha orientadora, Professora Maria Teresa Rebelo, desde já por me ter aceite e confiado em mim para a realização deste projeto. Foi uma pessoa que se mostrou desde logo bastante acessível e disponível para qualquer dúvida ou problema que surgisse, mesmo em fases em que pudesse andar mais ocupada e com escassez de tempo.

Agradeço também aos meus companheiros de laboratório/gabinete, Inês, Alberto e Maria João.

Inês e Alberto, obrigado pelas magníficas viagens por esse país a fora e pelo companheirismo e entreaajuda ao longo de todo o projeto. À Maria João agradeço o fato de nos ter recebido tão bem no gabinete e por se mostrar sempre disponível para ajudar. Sem vocês, todas aquelas tardes ao microscópio e a escrever a tese teriam sido bem mais aborrecidas.

Um muito obrigado a todos os amigos e colegas de faculdade que tive o prazer de conhecer ao longo destes dois anos e que, de uma forma ou de outra, também contribuíram para que aqui chegasse.

Por fim, mas não menos importantes, gostaria de agradecer aos meus familiares, pelo amor incondicional e pela constante preocupação e apoio nas fases mais difíceis. Dedico então este trabalho aos meus pais, pela confiança e sem os quais nada disto teria sido possível, e principalmente aos meus avós maternos que me criaram, estando presentes em todos os momentos da minha vida, e que fizeram de mim o homem que sou hoje. Não é possível expressar por palavras o agradecimento que tenho para convosco, mas muito obrigado por tudo!

Resumo

Os insetos constituem o grupo mais diversificado do planeta Terra, sendo a reciclagem da matéria orgânica uma das suas funções mais subestimadas. Em particular, as vulgarmente conhecidas por moscas varejeiras (Família Calliphoridae) têm ultimamente vindo a despertar o interesse da comunidade científica, principalmente na área das ciências forenses, onde podem ser utilizadas para a determinação de vários parâmetros relacionados com um cadáver, como por exemplo o Intervalo Pós-Morte (IPM), o local do crime, a presença de drogas, entre outras informações relevantes para as investigações criminais.

Em Portugal ainda existem poucos estudos acerca da morfologia destas espécies, tornando a sua identificação uma tarefa mais difícil e demorada. Posto isto, um dos principais objetivos deste projeto foi a construção de uma chave interativa, disponibilizada online (www.calliphoridaekey.weebly.com), que inclui um registo fotográfico das características diagnosticantes (somáticas e genitais) de algumas das espécies mais importantes desta família, nomeadamente *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794). É esperado que esta ferramenta venha trazer uma forma mais fácil e intuitiva de identificar as espécies referidas, contribuindo deste modo para o aumento da utilização da Entomologia Forense e para o melhor conhecimento da biodiversidade dos dípteros existentes em Portugal.

Palavras-chave: Biodiversidade, Calliphoridae, Entomologia Forense, Chaves de identificação.

Abstract

Insects are the most diverse group on planet Earth and the recycling of organic matter is one of their most underrated functions. In particular, the commonly known as blow flies (Calliphoridae) have raised the interest of the scientific community, especially in the forensic sciences field, where they can be used to provide multiple parameters related to a body, such as the Post-Mortem Interval (PMI), local of death, the presence of drugs, among other information relevant to criminal investigations.

In Portugal there are few studies related to the morphology of these species, making their identification a more difficult and time consuming task. Accordingly, the main aim of this project was the development of an interactive key, available online (www.calliphoridaekey.weebly.com), with photographic records of the morphological somatic and genital characters of some of the most important species in this family, including *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) and *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794). It is expected that this tool will bring an easier and intuitive way to identify these flies, thereby contributing to the use of Forensic Entomology and to a better understanding of the blowflies biodiversity found in Portugal.

Keywords: Biodiversity, Calliphoridae, Forensic Entomology, Identification keys.

Índice

Nota prévia	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	ix
1. Introdução	2
1.1 Entomologia Forense	2
1.1.1 Definição e aplicações	2
1.1.2 História	4
1.1.3 Insetos e a sua importância forense	6
1.1.4 Intervalo Pós-Morte (IPM)	10
1.2 Ordem Diptera	13
1.2.1 Morfologia geral de Diptera	13
1.2.2 Família Calliphoridae	17
1.2.2.1 Género <i>Calliphora</i>	18
1.2.2.2 Género <i>Lucilia</i>	19
1.2.2.3 Género <i>Chrysomya</i>	20
1.2.2.4 Género <i>Pollenia</i>	20
1.3 Entomologia Forense em Portugal	21
1.4 Importância da chave de identificação	22
2. Material e Métodos	24
2.1 Recolha do material	24
2.2 Montagem e etiquetagem	24
2.3 Seleção das características	26
2.4 Fotografia e construção da chave	26
2.5 Construção do website	27
3. Resultados	29
3.1 Características chave da família Calliphoridae	29
3.2 Chave pictórica	30
3.3 Website	40
4. Discussão	42
5. Conclusão	45
6. Bibliografia	47
7. Anexos	51

Índice de figuras

Fig. 1 Esquema síntese dos três principais ramos em que a Entomologia Forense se divide.....	2
Fig. 2 Esquema simplificado do ciclo de vida de uma mosca (Metamorfose completa), com os quatro estados em evidência (Figura adaptada de Gaensslen, 2009).	7
Fig. 3 Exemplo de um gráfico de sucessão entomológica (Figura adaptada de Byrd e Castner, 2010)	12
Fig. 4 Vista lateral com os três segmentos principais dos insetos e estruturas mais evidentes do tórax.	14
Fig. 5 A - Principais estruturas da cabeça; B - Asa com indicações da veia-tronco e das principais veias que distinguem a família Calliphoridae de outras famílias.....	15
Fig. 6 Três segmentos principais da pata.....	15
Fig. 7 Vista dorsal com indicação da localização de algumas estruturas essenciais para a separação de espécies.	16
Fig. 8 Vista lateral com as diferentes direções e planos.	17
Fig. 9 A – Posição correta em que os insetos devem ficar após a alfinetagem (Figura adaptada de University of Minnesota). B – Local de alfinetagem, deslocado ligeiramente para a direita (Figura adaptada de Almeida <i>et al.</i> (1998)).	25
Fig. 10 Exemplares devidamente alfinetados e etiquetados (Fotografia do autor). ..	25
Fig. 11 Microscópio utilizado para a análise e fotografia dos exemplares (Modelo Olympus SZX7) (Figura adaptada de Microscope Central).	26
Fig. 12 Características chave da família Calliphoridae. A – Calipteras de grandes dimensões e abdômen azul metálico; B – Abdômen verde metálico; C – Localização da linha de cerdas, no meron; D – Localização da notopleura, com duas cerdas; E – Localização da arista plumosa; F – Localização das veias M (curvada) e R4+5 e da célula r4+5.....	29
Fig. 13 Localização da veia tronco. A - Presença de pêlos; B - Ausência de pêlos.....	30
Fig. 14 Localização da <i>greater ampulla</i> . A - Presença de pêlos; B - Ausência de pêlos.	30
Fig. 15 Localização do espiráculo anterior, no tórax. A - Coloração clara; B - Coloração escura.	31
Fig. 16 Localização da margem anterior da asa, transparente.	31
Fig. 17 Presença de pêlos no 5º tergito abdominal (T5). A - Pêlos brancos; B - Pêlos pretos.....	32
Fig. 18 Localização das riscas pretas transversais nos segmentos abdominais III e IV.	32

Fig. 19 Localização dos 3 segmentos da antena. A - 3º segmento com coloração escura; B - 3º segmento com coloração alaranjada.....	33
Fig. 20 Vista lateral. A - Ausência de pêlos amarelos; Mosca com coloração em tons de verde metálico; B - Presença de pêlos amarelos; Mosca com coloração escura....	33
Fig. 21 Localização das calípteras inferiores. A - Calípteras com pêlos; B - Calípteras sem pêlos.	34
Fig. 22 Localização dos 3 pares de cerdas acrosticais, no tórax.	34
Fig. 23 Localização da <i>bucca</i> , na cabeça, e do espiráculo anterior, no tórax. A - <i>Bucca</i> laranja e espiráculo anterior amarelo; B - <i>Bucca</i> negra e espiráculo anterior escuro..	35
Fig. 24 Localização da basicosta, na margem costal da asa. A - Basicosta amarela; B - Basicosta negra.	35
Fig. 25 Localização das cerdas acrosticais, no tórax. A - 2 pares de cerdas; B - 3 pares de cerdas.	36
Fig. 26 Localização dos palpos, na cabeça. A - Coloração amarela; B - Coloração escura.	36
Fig. 27 Localização do calo umeral. A - Declive posterior com 7 pêlos; B - Declive posterior sem pêlos.	37
Fig. 28 Localização da risca coxopleural.	37
Fig. 29 A - Localização das calípteras; B - Localização da tíbia.	38
Fig. 30 Localização das calípteras, debaixo das asas. A - Coloração branca; B - Coloração castanha.	38
Fig. 31 Vista lateral do aparelho reprodutor, no abdômen. A - T6 convexo; B - T6 reto.	39
Fig. 32 A - Localização do fêmur, na pata; B - Localização da região ventral abdominal, com vestidura densa e predominantemente de coloração escura.	39
Fig. 33 Visão geral da página inicial do website.	40
Fig. 34 Localização da margem anterior da asa, escurecida.	51
Fig. 35 Localização do único par de cerdas acrosticais, no tórax.	51

Lista de abreviaturas

dm-cu – Veia Discal-Cubital Mediana (“Discal-Medial Cubital vein”);

EBCI – Encontro sobre Biodiversidade e Conservação de Insetos;

EF – Entomologia Forense;

IPM – Intervalo Pós-Morte;

M – Veia Mediana (“Medial vein”);

r-m – Veia Radial Mediana (“Radial-Medial vein”);

r4+5 – Célula Radial (“Radial vein”);

R4+5 – Veia Radial (“Radial vein”);

INTRODUÇÃO



1. Introdução

1.1 Entomologia Forense

1.1.1 Definição e aplicações

A Entomologia Forense (EF) é um ramo das ciências forenses que tem vindo a ganhar cada vez mais espaço na comunidade científica. Como o próprio nome indica, esta área de estudo está relacionada com a utilização dos insetos (ou outros artrópodes) para a resolução de casos de investigação legais, quer sejam civis ou criminais, podendo envolver tanto humanos como animais (Catts e Goff, 1992; Greenberg e Charles, 2002; Amendt *et al*, 2007; Byrd e Castner, 2010; Gennard, 2012).

Esta área encontra-se subdividida em três ramos principais (Fig. 1): urbana, de produtos armazenados e médico-legal (Oliveira-costa, 2013).

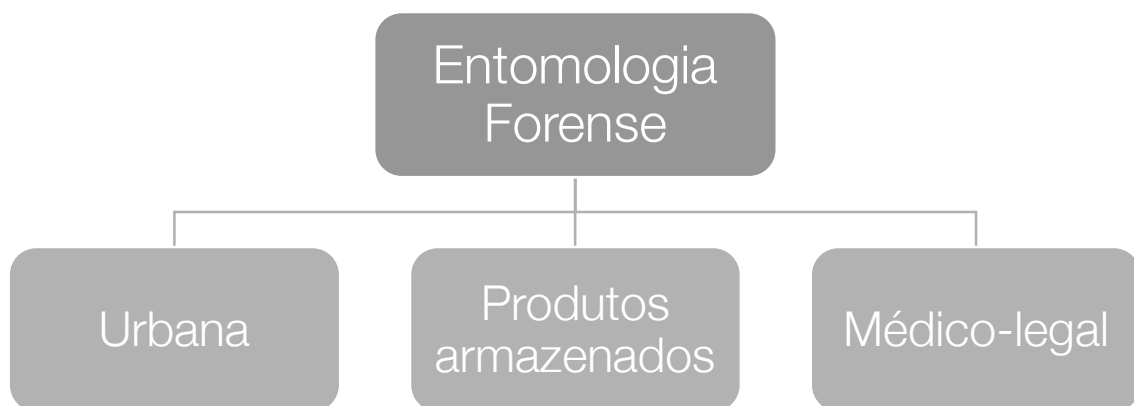


Fig. 1 Esquema síntese dos três principais ramos em que a Entomologia Forense se divide.

Ao contrário do que se possa pensar, a EF não está relacionada apenas com a utilização dos insetos para a resolução de casos de homicídios ou para obtenção de informação acerca de cadáveres. Embora a entomologia médico-legal seja uma das mais mediáticas, existem outro tipo de aplicações para a EF. A entomologia urbana, por exemplo, está relacionada com questões ligadas aos insetos que vivem em contato com o homem (ex: térmitas, baratas, moscas). Esta pode ser útil no que diz respeito à resolução de casos relacionados com águas não convenientemente

tratadas, casas infestadas com insetos, trabalhos inadequados de desinfecção, entre outras aplicações. Outro exemplo é a entomologia dos produtos armazenados, que visa a resolução de questões ligadas aos produtos processados que possam conter insetos, parte deles, ou estarem danificados devido à sua atividade (ex: cereais, vegetais em conserva, sanduíches, etc.) (Byrd e Castner, 2010; Rivers e Dahlem, 2014). Resumindo, estes dois ramos da EF atuam principalmente na área civil, e estão diretamente relacionados aos casos em que os insetos se tornam pragas, ou seja, que são indesejáveis por transmitirem doenças, danificarem estruturas ou contaminarem produtos alimentares (Oliveira-Costa, 2013).

Ainda assim, a EF tem sido principalmente utilizada em crimes como homicídios (ramo médico-legal), em que se sabe pouca informação acerca de um determinado cadáver, ou até em casos de violações, mostrando ser uma ferramenta útil e complementar às investigações dos peritos forenses (Greenberg e Charles, 2002; Byrd e Castner, 2010). O conceito base deste ramo assenta principalmente na interpretação do comportamento dos insetos encontrados em associação com os cadáveres em decomposição, que é dependente da localização geográfica e de vários outros fatores bióticos e abióticos (Jackson e Jackson, 2011; Rivers e Dahlem, 2014). Esta interpretação requer um conhecimento prévio acerca da distribuição e biologia (reprodução e desenvolvimento) das várias espécies que, além de outros fatores, está muito relacionado com a temperatura, e também o conhecimento da sucessão entomológica da região em causa (Amendt *et al*, 2007; Byrd e Castner, 2010). Através dessa análise é possível a determinação de vários parâmetros que os métodos patológicos já não conseguem fornecer, sendo o principal a estimativa de um Intervalo Pós-Morte (IPM) de um cadáver, ou seja, a determinação do tempo mínimo desde a morte (Singh e Sharma, 2008; Amendt *et al*, 2011). Este conceito estará explicado com mais detalhes no capítulo 1.1.4.

É possível ainda determinar outros parâmetros relacionados com o crime, como por exemplo o local onde a morte terá ocorrido, a determinação da existência de abusos sexuais (através da presença de sémen), casos de negligência (ex: falta de higiene ou maus tratos), determinação da presença de drogas (entomotoxicologia), entre outros (Cruz, 2006; Oliveira-Costa, 2013).

1.1.2 História

Desde que o ser humano começou a habitar o planeta Terra que há registros dos insetos como sendo seres indesejáveis por danificarem alimentos e estruturas, e serem importantes vetores de doenças que podem ser fatais (Rivers e Dahlem, 2014).

No entanto, para além destas interações negativas que estes animais têm com o ser humano, foi descoberto que estes podem ser muito úteis em algumas situações, como por exemplo ajudarem a desvendar crimes. Registos da utilização de insetos na resolução de crimes remontam ao século X. Os chineses, por exemplo, utilizavam moscas e outros insetos como forma de identificação de armas de crime. Mas um dos exemplos mais relatados na literatura aparece mais tarde, documentado num livro chinês de medicina legal - *Washing Away of Wrongs* - publicado em 1235, por Sung Tz'u. Neste livro é mencionado um caso de homicídio, ocorrido num arrozal na China, em que um dos trabalhadores foi encontrado degolado. O caso foi resolvido no dia após o crime, quando todos os suspeitos foram reunidos e as suas foices foram colocadas no chão. Rapidamente uma foice se destacou pela grande quantidade de moscas varejeiras (Diptera da família Calliphoridae) que atraiu, possivelmente devido aos odores resultantes dos restos de substâncias orgânicas (ex: sangue) impercetíveis a olho nu. Veio efetivamente mais tarde a comprovar-se ser a arma do crime pelo fato do assassino ter confessado após ter sido confrontado com essa prova (Benecke, 2001; Gennard, 2012; Romana *et al*, 2012; Rivers e Dahlem, 2014).

Mais tarde, entre os séculos XVII e XIX, deram-se grandes avanços na área da biologia que permitiram que a EF se tornasse uma área de estudo científico. Com grande contributo para esta evolução destacam-se as experiências do físico e naturalista italiano Francesco Redi (1667), que demonstrou que as larvas presentes na carne de certos animais se desenvolviam a partir dos ovos que eram colocados por moscas, deitando por terra a ideia de que as larvas simplesmente surgiam a partir da carne (teoria da geração espontânea). Neste mesmo período destaca-se também Linnaeus (1735), pioneiro e criador da classificação científica e da nomenclatura binominal ainda hoje em dia utilizada, que veio facilitar o método de identificação dos insetos (Gennard, 2012; Rivers e Dahlem, 2014). Em 1831 foi relatada por Mateus Orfila,

um médico e químico catalão naturalizado francês, a importância das larvas de insetos na decomposição cadavérica, após observar que os corpos eram colonizados por diversos artrópodes (Cainé *et al*, 2006).

A primeira associação dos insetos a um IPM surge por volta do ano de 1850, quando foi encontrado o corpo de um bebê mumificado na chaminé de um edifício. Após uma autópsia ao corpo, efetuada pelo Dr. Louis Bergeret d'Arbois, verificou-se a existência de larvas de *Sarcophaga carnaria* (Linnaeus 1758) e de algumas traças. Este chegou então à conclusão que o corpo estaria enclausurado na chaminé desde o ano de 1848, podendo-se então isentar de quaisquer culpas os residentes do apartamento naquela altura (Benecke, 2001; Oliveira-Costa, 2013). A EF começou a ganhar destaque por todo o mundo após o ano de 1894, quando foram verificados pela primeira vez, pelo veterinário francês Jean Pierre Mégnin, os oito estados de decomposição de um cadáver humano, derivados da sucessão de insetos que colonizam o corpo após a morte. Foi ainda mostrado que estes estados podem variar de acordo com várias condições, como por exemplo a temperatura ou o tamanho do cadáver. Todas estas descobertas foram relatadas no livro *La faune des Cadavres (A fauna dos Cadáveres)*, publicado em França (Benecke, 2001; Cainé *et al*, 2006; Oliveira-Costa, 2013).

Já no século XX a EF revelou-se bastante importante no que diz respeito a vários casos criminais. Um dos mais conhecidos deu-se a 29 de Setembro de 1935, na Escócia, quando foram encontradas várias partes de cadáveres num rio, tendo sido mais tarde identificados como pertencentes a duas mulheres. Aliado a outras evidências, encontraram-se larvas de 3º estágio de *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), revelando que os ovos teriam sido postos antes dos corpos terem sido atirados ao rio, permitindo chegar-se à conclusão que o marido de uma das vítimas tinha sido o responsável pelo crime (Gennard, 2012).

Atualmente a EF é aceite como uma ferramenta importante na resolução de investigações criminais um pouco por todo o mundo, e é utilizada em muitos países como por exemplo os Estados Unidos da América, Canada, Rússia, França, Japão, entre outros (Benecke, 2001; Singh e Sharma, 2008).

1.1.3 Insetos e a sua importância forense

Grande parte dos artrópodes são responsáveis pela transmissão de diversas doenças, sendo portadores de vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintes. Febre tifóide, carbúnculo, disenteria e boubá (doença infecciosa da pele) são apenas alguns dos exemplos de doenças que as moscas podem transmitir (Byrd e Castner, 2010).

Os insetos da família Calliphoridae, para além de grande importância no que diz respeito à área forense, podem ser também muito úteis na área veterinária. Isto deve-se ao facto de algumas destas moscas serem parasitas de animais e, portanto, terem a capacidade de transmitir algumas zoonoses¹. Estas moscas são as principais responsáveis pelas miíases secundárias, que é basicamente a infestação de uma ferida aberta, por exemplo, por ovos de moscas-varejeiras, que ao eclodirem se tornam larvas que se vão alimentar do tecido vivo. Isto pode tornar-se num problema grave, principalmente em países pouco desenvolvidos onde há poucas condições de higiene, uma vez que não sendo tratado pode mesmo levar à morte do indivíduo infetado (Gullan e Cranston, 2014; Rebelo *et al*, 2014).

Como já referido anteriormente, esta área pode também estar diretamente relacionada com a área forense, na medida em que os insetos presentes em feridas abertas podem indicar situações de negligência ou maus tratos, tanto de pessoas como de animais (Singh e Sharma, 2008; Rebelo *et al*, 2014).

A classe dos insetos, pertencente ao filo Arthropoda, constitui o grupo de seres vivos melhor adaptado e mais diversificado do planeta Terra (Rivers e Dahlem, 2014; Gaensslen, 2009). Este sucesso deve-se fundamentalmente ao facto de terem uma taxa de reprodução muito rápida e elevado metabolismo energético, da sua facilidade para se deslocarem devido à presença de asas (na maior parte dos indivíduos) e também ao facto de possuírem um tamanho reduzido, que lhes permite colonizar os mais diversos tipos de habitats (Gomes, 2010). Estes possuem várias características que os distinguem dos outros artrópodes, entre elas o facto de possuírem três pares de patas articuladas, o corpo segmentado em três partes (cabeça, tórax e abdómen) e coberto por um exosqueleto, os olhos compostos e a presença de duas antenas (Taylor *et al*,

¹ Doenças ou infeções que podem ser transmitidas dos animais para o ser humano.

2007; Rivers e Dahlem, 2014). Outra característica comum a todos os insetos é a semelhança no ciclo de vida. Os insetos holometabólicos² apresentam quatro fases: Ovo, larva (vários estádios), pupa e inseto adulto/imago (Fig. 2), enquanto que os insetos hemimetabólicos³ não apresentam as fases de larva e pupa, passando da fase de ninfa (forma imatura) diretamente para o inseto adulto (Gullan e Cranston, 2014).

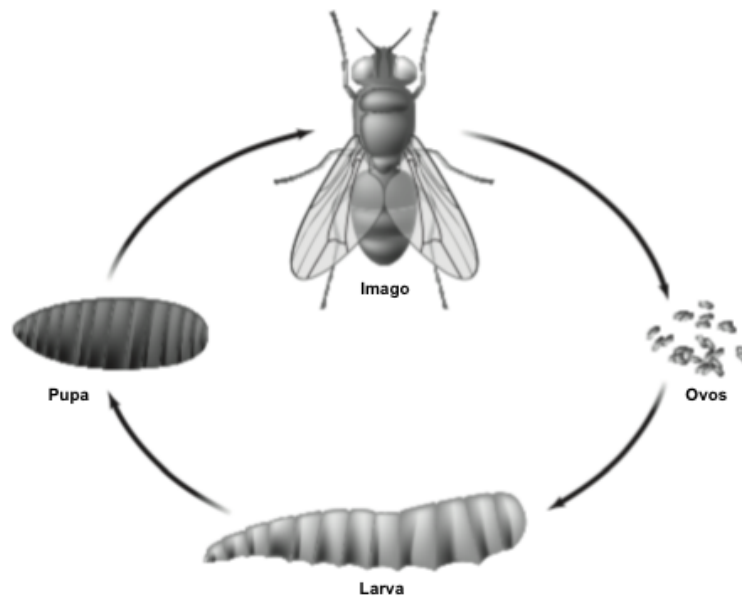


Fig. 2 Esquema simplificado do ciclo de vida de uma mosca (Metamorfose completa), com os quatro estados em evidência (Figura adaptada de Gaensslen, 2009).

Estes seres são na maior parte das vezes considerados como indesejáveis por serem transmissores de doenças, por destruírem habitações e alimentos ou simplesmente por estarem associados a sítios e objetos repugnantes para o ser humano (Gaensslen, 2009). No entanto, os insetos têm um papel fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas, sendo fundamentais na polinização de várias plantas, servirem de alimento a outros animais e possuírem um papel indispensável na decomposição e reciclagem dos materiais orgânicos (Gullan e Cranston, 2014).

Uma das funções mais subestimadas dos insetos assenta exatamente no seu papel como um dos principais recicladores da matéria orgânica, apresentando-se

² Tipo de insetos que apresentam metamorfose completa – 4 fases de desenvolvimento.

³ Tipo de insetos que apresentam metamorfose incompleta – 3 fases de desenvolvimento.

como consumidores e decompositores de excrementos e de restos, tanto de animais (cadáveres) como vegetais (González, 1997). Os cadáveres atraem centenas de artrópodes que se vão alimentar, viver e reproduzir a partir da matéria orgânica em decomposição, principalmente as moscas (Diptera), os escaravelhos (Coleoptera) e as suas larvas. Sendo os insetos o maior e mais importante grupo biológico na Terra, estes são muito abundantes e podem ser encontrados nos mais variados ambientes e locais do planeta, incluindo em cadáveres e cenas de crime. As moscas saprófitas⁴ são um dos principais grupos de insetos com elevada importância forense na medida em que são as primeiras a aparecer no cadáver, consomem a maior parte dos tecidos e apresentam padrões de sucessão muito semelhantes em várias regiões do planeta, especialmente ao nível da família (Catts e Goff, 1992; Byrd e Castner, 2010; Amendt *et al*, 2011). Isto deve-se ao facto de as moscas terem uma grande facilidade para se deslocarem em busca de alimento ou de um local apropriado para a postura dos ovos, sendo a carne em putrefação um dos sítios favoritos para tal (Oliveira-Costa, 2013).

A utilização dos insetos como indicadores de vários parâmetros forenses tem sido cada vez mais aceite em todo o mundo, ao longo dos últimos anos (Byrd e Castner, 2010). A principal vantagem de se utilizarem os insetos para este fim deve-se ao facto de, tal como já referido, estes serem os primeiros organismos a detetar o cadáver e também por estarem presentes em todas as fases de decomposição do corpo (Carvalho *et al*, 2000; Romana *et al*, 2012).

Um dos principais aspetos desta área é a utilização dos insetos para estimar o IPM que, segundo Amendt *et al* (2007), é baseado em dois métodos principais: 1) observação da sucessão de insetos que colonizam o cadáver; 2) cálculo da idade das larvas/pupas encontradas, com base no conhecimento do ciclo de vida das espécies (Rebelo *et al*, 2014; Rochefort *et al*, 2015). O primeiro método baseia-se na sucessão entomológica. No processo de deterioração de um cadáver, é possível verificar que os insetos possuem um padrão de colonização ao longo dos vários estados de decomposição. Isto quer dizer que os insetos que colonizam o cadáver nas primeiras horas após a morte vão ser diferente dos insetos que vão colonizar o cadáver ao fim

⁴ Organismos que se alimentam de matéria orgânica em decomposição.

de uns dias. Caso existam estudos prévios acerca desse padrão de sucessão numa determinada área, e de acordo com as diferentes temperaturas, é possível estimar o IPM através da observação dos insetos que estão presentes no corpo aquando da sua descoberta (Huffman e Wallace, 2012). O outro método para a estimativa do IPM requer a compreensão do ciclo de vida do inseto e é através da determinação aproximada da idade das larvas e pupas presentes no cadáver, ou seja, através do cálculo do tempo que o inseto levou para se desenvolver desde a fase de ovo até ao estado em que foi encontrado no corpo (Cooper e Cooper, 2007). Uma vez que a oviposição, em certas espécies, pode dar-se apenas alguns minutos após a morte, o IPM é estimado com alguma precisão, ao contrário de outros métodos que permitem apenas aproximações (Amendt *et al*, 2011).

Por outro lado, os insetos podem também, por exemplo, ter um papel revelador em casos de negligência. Algumas moscas, como é o caso de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), são atraídas por certos odores como por exemplo a amónia, indicando contaminação urinária ou fecal. Estas podem então ser indicadoras de casos de negligência relacionados com animais domésticos ou em cativeiro e infantários ou lares de idosos, onde a higiene não é efetuada corretamente (Gennard, 2012).

O local do crime é outro dos parâmetros que pode ser determinado através da EF, uma vez que diferentes espécies têm preferência por regiões e condições ambientais diferentes (Cruz, 2006). Encontrar espécies de insetos no cadáver que não são características da zona pode ser um indicador de que aquele não foi o local do crime e que provavelmente o corpo terá sido deslocado. Um exemplo pode ser identificar insetos que habitam preferencialmente o meio rural num cadáver encontrado no meio urbano, ou vice-versa. Para que isto seja possível é essencial haver um conhecimento geográfico da fauna local (Jackson e Jackson, 2011; Gennard, 2012). Relacionado a este aspeto pode estar também a resolução de casos de tráfico de droga, uma vez que se forem encontrados insetos associados a essas drogas é possível determinar o local de proveniência da droga (Singh e Sharma, 2008).

A presença de drogas em cadáveres pode também ser determinada uma vez que as larvas dos insetos ingerem os metabolitos químicos, além de que certas substâncias podem alterar o padrão de desenvolvimento dos insetos, modificando

por exemplo os intervalos de tempo necessários para passarem de um estado para outro (ex: de larva para pupa) (Romana *et al*, 2012). Isto revela-se útil em casos em que já não restem fluidos ou tecidos no cadáver e, portanto, já não é possível efetuar as análises toxicológicas. É possível fazer então a deteção de possíveis drogas através da análise dos insetos encontrados associados ao corpo e perceber se ocorreu algum tipo de envenenamento, por exemplo (Jackson e Jackson, 2011; Huffman e Wallace, 2012).

A ampla distribuição dos insetos pelo mundo permite uma série de aplicações para a EF, sendo a principal a determinação das condições de morte de um determinado indivíduo e o IPM (Benecke, 2001). Para isso é necessário que, para além de ter que existir um conhecimento biológico prévio das espécies com maior importância forense, existam também outros métodos para identificação rápida e fácil das espécies, como coleções entomológicas - que são fundamentais para que a determinação das espécies, utilizando métodos que não envolvam técnicas de DNA, seja cada vez mais precisa - ou chaves dicotómicas interativas - que permitam aos técnicos forenses especializados a rápida identificação de uma determinada família ou espécie (Byrd e Castner, 2010).

1.1.4 Intervalo Pós-Morte (IPM)

O Intervalo Pós-Morte (IPM) não é nada mais do que uma janela temporal que indica uma estimativa de há quanto tempo a morte terá ocorrido. Esta informação é relevante em termos forenses, pois pode ajudar a reconstruir os eventos e circunstâncias que levaram à morte e a desvendar tanto a identidade do cadáver como da pessoa responsável pelo crime (Singh e Sharma, 2008; Gennard, 2012; Rivers e Dahlem, 2014).

Embora possua diversas aplicações dentro do ramo forense, a principal e mais utilizada aplicação da EF é a estimativa de um IPM (Amendt *et al*, 2010). Caso a morte tenha sido muito recente, normalmente é possível aferir um IPM através dos métodos tradicionais de patologia, como por exemplo medição da temperatura do corpo, *rigor-mortis* ou observação do estado de decomposição de alguns órgãos. No entanto, passado algum tempo (após 48-72h) já não é possível determinar um IPM através

destes métodos e, nestas situações a EF pode ser uma alternativa (Oliveira-Costa, 2013; Rivers e Dahlem, 2014).

Após a morte, o corpo é rapidamente colonizado por uma diversidade de fungos e bactérias (Bornemissza 1957). No reino animal, os insetos são os primeiros a chegar, sendo atraídos para um corpo em decomposição minutos após a morte. Nos primeiros instantes predominam as moscas (Diptera) das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae, enquanto que nos estados mais avançados de decomposição normalmente aparecem mais associados os escaravelhos (Coleptera) (Byrd e Castner, 2010). É comum aparecer outro tipo de insetos ou mesmo artrópodes, embora esses possam não estar diretamente associados ao cadáver, mas sim para se alimentarem dos ovos colocados pelos insetos saprófitos (Amendt *et al*, 2011; Gennard, 2012).

Uma das formas de se poder calcular o IPM com a ajuda da EF é através da observação do padrão de sucessão entomológica. Este fenómeno, inicialmente observado por Mégnin (1894), reside no facto das espécies colonizarem os cadáveres apenas por um período de tempo limitado (Benecke, 2004). Os insetos saprófitos são atraídos pelos odores libertados durante a decomposição, que vão variando ao longo de todo esse processo (Gunn, 2009). O facto de diferentes espécies de insetos terem preferência por diferentes odores faz com que os organismos que colonizam o cadáver num estado de decomposição mais fresco sejam diferentes daqueles encontrados no cadáver já num estado de decomposição mais tardio (Fig. 3). É, portanto, possível associar uma determinada espécie ou grupo a um determinado estado da decomposição do cadáver (Benecke, 2004). Esta sucessão é dependente de vários fatores, e varia de região para região. Posto isto, para que a estimativa do IPM seja o mais fidedigna possível, é fundamental haver o conhecimento da sucessão entomológica de um determinado local para que seja possível determinar o IPM, fazendo uma comparação dos insetos encontrados com o que foi observado nesses estudos prévios. Uma vez que é necessário algum tempo para que se possa observar este padrão, este método só será útil em ocasiões em que o cadáver já esteja num estado de decomposição bastante avançado (Oliveira-Costa, 2013).

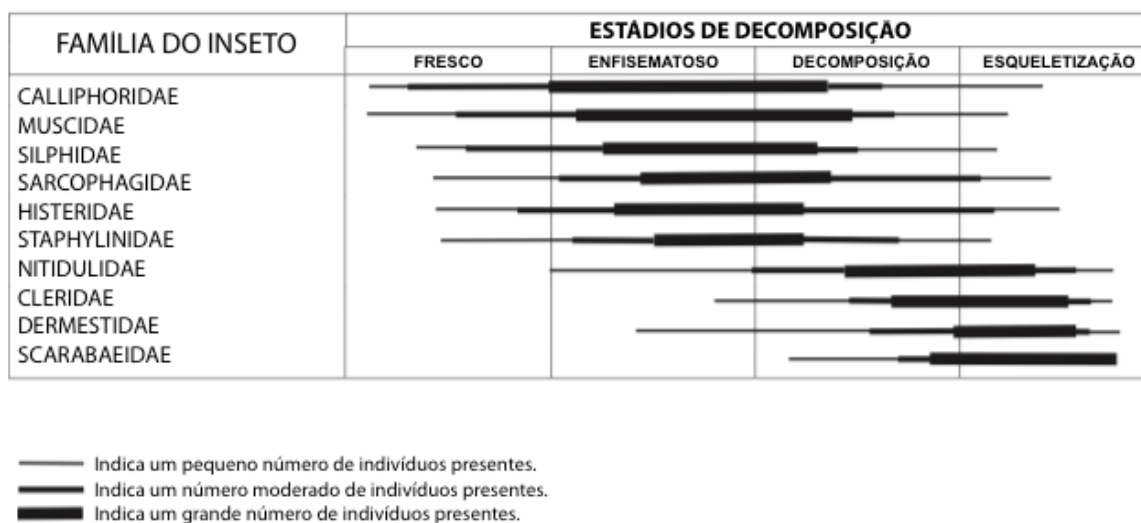


Fig. 3 Exemplo de um gráfico de sucessão entomológica (Figura adaptada de Byrd e Castner, 2010)

Para além do padrão de sucessão entomológica, o IPM também pode ser calculado através dos insetos imaturos encontrados no cadáver (Amendt *et al*, 2010). Uma vez ocorrida a oviposição, sabe-se que as moscas da família Calliphoridae passam por várias fases até chegarem à fase adulta: Ovo, larvas de 1º estágio, larvas de 2º estágio, larvas de 3º estágio, pré-pupa, pupa e fase adulta (Gullan e Cranston, 2014). A duração de cada uma das fases e do ciclo em geral difere de espécie para espécie e é dependente de fatores ambientais, principalmente a temperatura e a humidade. Se houver um conhecimento biológico das várias espécies (ex: ao fim de quanto tempo, e de acordo com diferentes temperaturas, é que os organismos atingem as diferentes fases de desenvolvimento) é possível calcular, com alguma precisão, a idade das larvas mais antigas ou pupas encontradas no cadáver, e deste modo estipular um IPM mínimo (Cruz, 2006). Este método, no entanto, apresenta uma grande desvantagem pelo fato do conhecimento do ciclo de vida das espécies ser proveniente de estudos laboratoriais, que são normalmente efetuados sob condições de temperaturas constantes, não refletindo o que ocorre *in vivo* (Rebelo *et al*, 2014).

1.2 Ordem Diptera

A ordem diptera está dividida basicamente em duas sub-ordens: a) Brachycera, onde se incluem todas as moscas; b) Nematocera, que inclui todos os mosquitos e outros. Esta é uma das ordens com maior interesse médico-forense, uma vez que estes insetos são importantes transmissores de doenças e os primeiros colonizadores de cadáveres (Oliveira-Costa, 2013; Gullan e Cranston, 2014; Rochefort *et al*, 2015).

A ordem Diptera, que compreende cerca de 86000 espécies (Byrd e Castner, 2010), é facilmente distinguível de outras ordens pela existência de um par de asas membranosas frontais bem desenvolvido nos adultos, enquanto que as asas anteriores se encontram modificadas em estruturas bem mais pequenas, denominadas de halteres, que têm como principal função o equilíbrio durante o voo (Smith, 1986; Gennard, 2012). Nos estados imaturos (larvas) a principal característica é a ausência de patas verdadeiras (Gullan e Cranston, 2014). No que diz respeito ao seu desenvolvimento, os insetos pertencentes a esta ordem apresentam metamorfose completa, que significa que apresentam o estado de pupa (Gennard, 2012). Normalmente estes estados dividem-se em ovo, larva, pupa e adulto (Cruz, 2006).

No que diz respeito à EF, juntamente com as famílias Sarcophagidae e Muscidae, Calliphoridae está entre as mais importantes uma vez que estas moscas utilizam os cadáveres como alimento e para completarem o seu ciclo de vida (Byrd e Castner, 2010; Ubero-Pascal *et al*, 2010; Rochefort *et al*, 2015).

O foco desta dissertação será a família Calliphoridae e, como tal, será efetuada mais à frente uma descrição das principais espécies incluídas neste grupo (Ver 1.2.2).

1.2.1 Morfologia geral de Diptera

Para se poder identificar corretamente as espécies utilizando as chaves dicotómicas é necessário o conhecimento da morfologia dos indivíduos, como por exemplo o nome dado às principais estruturas. De seguida será feita uma descrição, apoiada com fotografias, das principais características que definem a ordem Diptera, mais focada nas moscas.

Começando pelo aspeto geral, tal como todos os insetos, as moscas apresentam o corpo rígido, devido à existência de um exosqueleto, que se encontra segmentado em três partes: cabeça, tórax e abdómen. A característica principal que separa os Diptera dos outros grupos é a existência de apenas duas asas, sendo que o par anterior se encontra modificado em estruturas de estabilização durante o voo, denominadas de halteres (Byrd e Castner, 2010). Estas estruturas estão indicadas na figura 4, juntamente com outras estruturas importantes para a separação das espécies dentro da família Calliphoridae, como é caso do espiráculo anterior, da *greater ampulla* e das calípteras (Gennard, 2012).

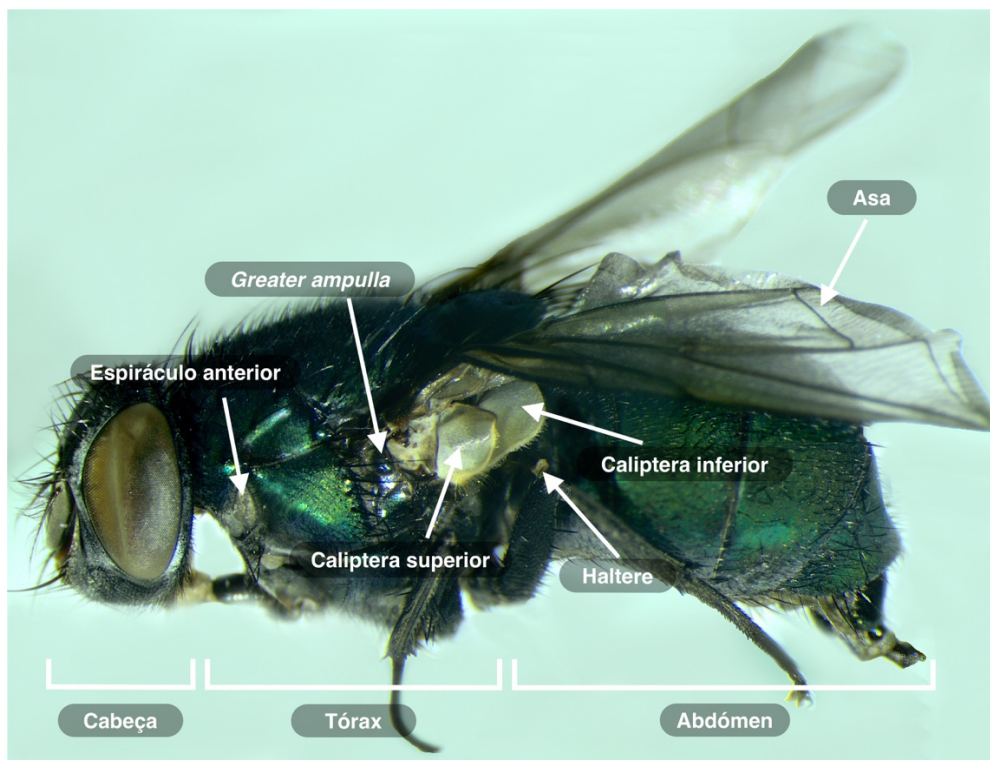


Fig. 4 Vista lateral com os três segmentos principais dos insetos e estruturas mais evidentes do tórax.

Na figura 5A encontram-se detalhadas as estruturas da cabeça mais importantes para a identificação das espécies, nomeadamente a arista, a antena, o sulco facial, os palpos, a dilatação genal e a gena posterior.

No que diz respeito às veias existentes na asa, as principais para identificação são a veia tronco, r-m, dm-cu, M, e R4+5, que estão devidamente indicadas na figura 5B.

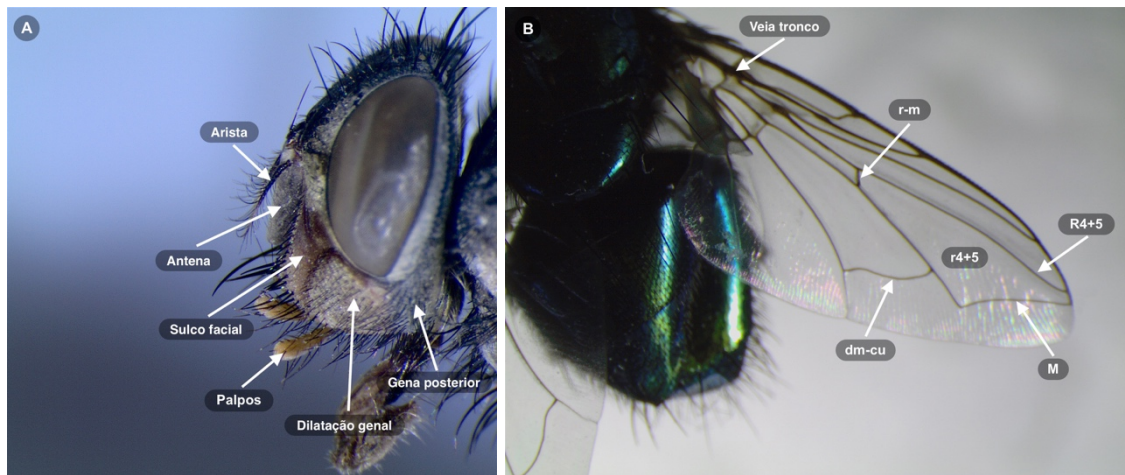


Fig. 5 A - Principais estruturas da cabeça; **B** - Asa com indicações da veia-tronco e das principais veias que distinguem a família Calliphoridae de outras famílias.

Também tal como todos os insetos, as moscas apresentam três pares de patas que se encontram todas inseridas no tórax. Estas patas dividem-se basicamente em três segmentos a seguir à coxa, inserida no tórax: fémur, tíbia e tarso (Fig. 6).

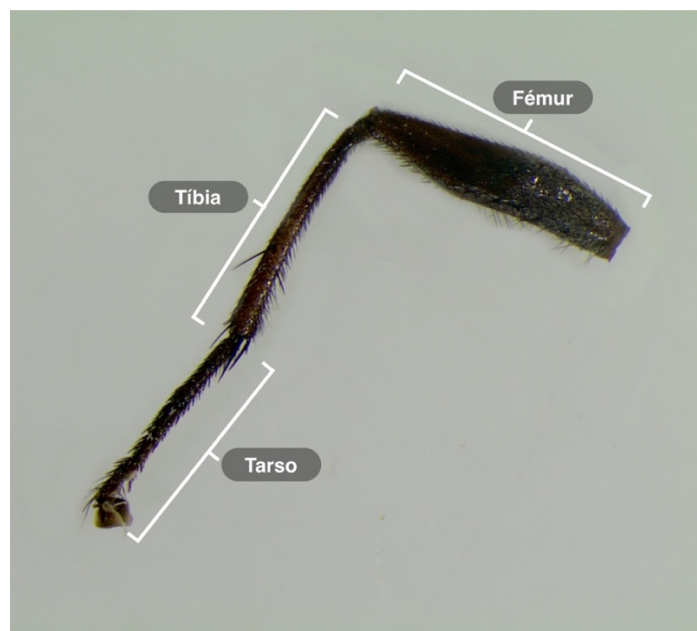


Fig. 6 Três segmentos principais da pata.

Na figura 7 estão indicadas as duas divisões da área sutural bem como outras estruturas, também importantes no que diz respeito à separação das espécies dentro desta família, incluindo as cerdas acrosticais, a basicosta, o escutelo e o calo umeral.

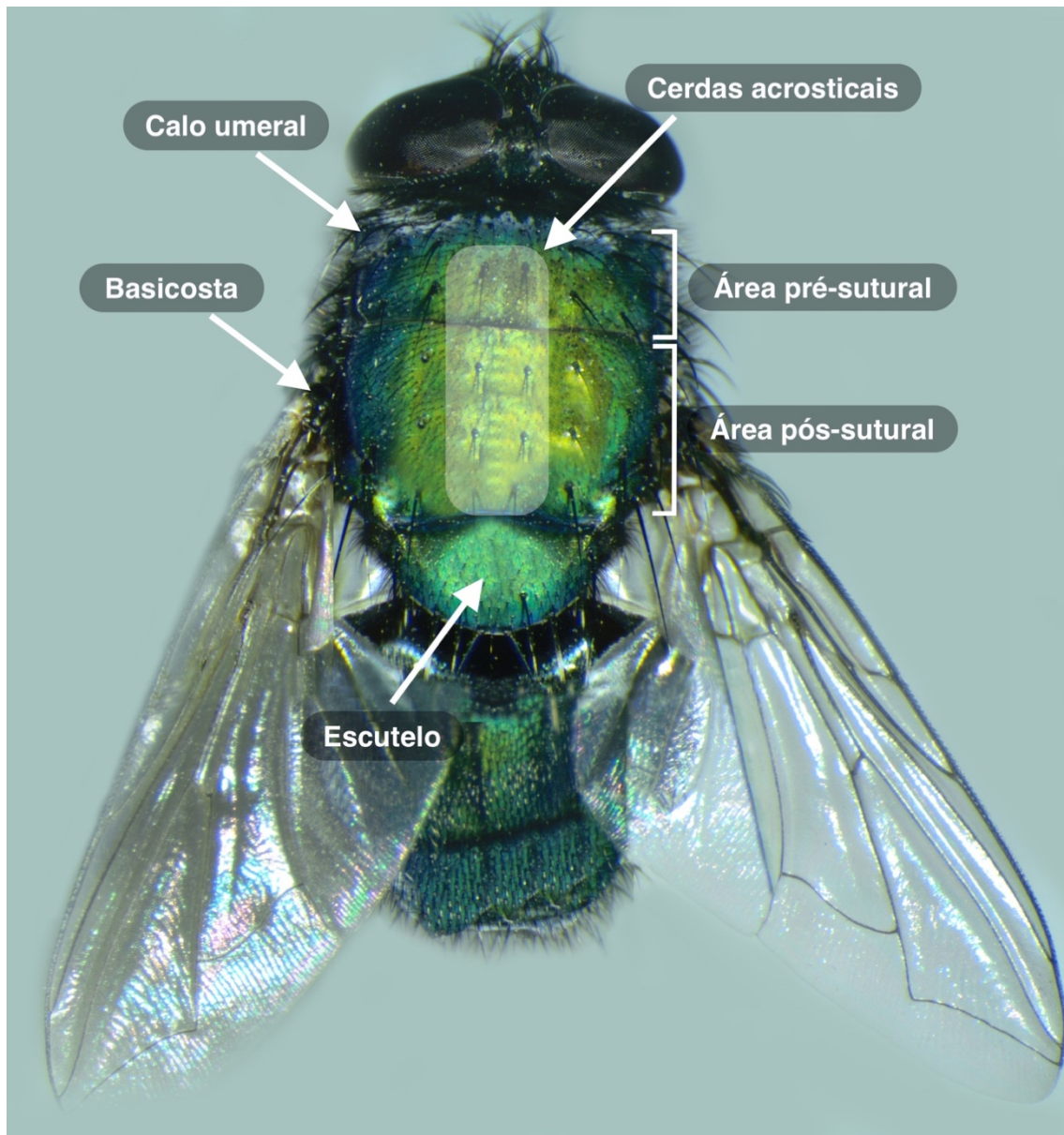


Fig. 7 Vista dorsal com indicação da localização de algumas estruturas essenciais para a separação de espécies.

Por fim, na figura 8 é possível encontrar os diferentes planos e direcções que normalmente são utilizados nas chaves dicotômicas para indicar a posição em que a estrutura a ser identificada se encontra. Dorsal e ventral referem-se respetivamente à parte superior e inferior do corpo do inseto. Anterior e posterior fazem indicação se a estrutura se encontra mais próxima da região da cabeça ou do abdômen, respetivamente. Relativamente às designações de apical ou basal, estas são mais

utilizadas para os apêndices, na medida em que dão indicações se uma determinada secção se encontra mais próxima (basal) ou mais afastada (apical) do corpo do inseto.



Fig. 8 Vista lateral com as diferentes direções e planos.

1.2.2 Família Calliphoridae

Para interpretar uma cena de crime, utilizando a EF, é necessário saber que tipo de insetos colonizam os cadáveres e conhecer aspetos relacionados com a sua biologia e comportamento (Gennard, 2012).

Tal como já referido anteriormente, os insetos pertencentes à família Calliphoridae (Ordem Diptera), comumente designados de moscas varejeiras, são dos primeiros a aparecer num corpo em decomposição. Este fato faz com que os califorídeos sejam considerados uma das famílias com maior importância forense. Na Europa, por exemplo, entre os primeiros insetos colonizadores de cadáveres temos as espécies *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) e *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), todas elas pertencentes à família Calliphoridae

(Gennard, 2012). A grande quantidade de ovos que as fêmeas depositam nos cadáveres faz com que esta família tenha grande importância também no que diz respeito à decomposição e reciclagem da matéria orgânica (Rognes, 2011).

Esta família, que contém mais de 1000 espécies (Smith, 1986; Byrd e Castner, 2010) possui também características muito distintas de outras moscas. Estas costumam apresentar um corpo de tamanho médio a grande e possuem uma coloração escura com reflexos de cores metálicas em tons de verde ou azul, embora também hajam algumas espécies com tons escuros e não metálicos (ex: Género *Pollenia*) (Rognes, 2011; Oliveira-Costa, 2013; Rivers e Dahlem, 2014). Outras características morfológicas mais detalhadas serão encontradas no capítulo dos resultados.

São organismos que são muito atraídos por excrementos e matéria orgânica em decomposição, sendo importantes espécies para a determinação do IPM. O seu ciclo de vida é constituído por 6 fases: ovo, larva (3 estádios), pupa e imago (Cruz, 2006).

Entre os géneros desta família com maior importância forense em Portugal encontram-se *Calliphora*, *Lucilia*, *Chrysomya* e *Pollenia* (Rivers e Dahlem, 2014). Será efetuada, de seguida, uma breve descrição das principais espécies destes géneros.

1.2.2.1 Género *Calliphora*

Calliphora vicina (Robineau-Desvoidy, 1830) e *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) são as espécies mais importantes deste género. Vulgarmente chamadas de moscas azuis, devido ao tom azul metálico que o seu abdómen possui, apresentam muitas cerdas, tanto no tórax como no abdómen, e têm tamanhos variáveis entre os 9 e 11mm (Gennard, 2012; Huffman e Wallace, 2012).

Ambas as espécies são muito semelhantes sendo distinguidas principalmente pela tonalidade da parte inferior da cabeça, que possui um tom avermelhado em *C. vicina* e um tom negro em *C. vomitoria*, e também pela coloração dos espiráculos anteriores, cor-de-laranja em *C. vicina* e castanho em *C. vomitoria* (Smith, 1986; Gennard, 2012). Indivíduos saudáveis da espécie *C. vomitoria* são ligeiramente maiores e habitam preferencialmente habitats rurais, ao contrário da espécie *C. vicina* que é

comummente mais encontrada nos ambientes urbanos (Rivers e Dahlem, 2014). *C vomitoria* apresenta também um ciclo de vida mais longo (Gennard, 2012).

Os adultos são muito atraídos por fezes e matéria em putrefação, sendo estas espécies essenciais na decomposição da matéria orgânica (Cainé, 2010). Estas espécies não costumam estar ativas durante a noite, pelo que se forem encontrados ovos num cadáver durante a noite é muito provável que esses ovos tenham sido postos várias horas antes, durante o dia (Smith, 1986). As moscas pertencentes a este género são ainda caracterizadas por colonizarem diversos tipos de habitats, sendo frequentemente encontradas em cadáveres humanos, advindo daí a sua grande importância na EF (Cainé, 2010).

Na chave de identificação desenvolvida neste trabalho estão incluídas as espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*.

1.2.2.2 Género *Lucilia*

Devido à tonalidade verde metálica do seu abdómen, os indivíduos pertencentes a este género são normalmente designados por moscas verdes (Gennard, 2012). Sendo insetos um pouco mais pequenos e com menos cerdas que os *Calliphora*, estes apresentam variações no comprimento entre 4 e 10mm (Smith, 1986). Algumas das espécies com mais importância e mais bem descritas na literatura incluem *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826) e *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) (Cainé *et al*, 2006; Cainé 2010; Rivers e Dahlem, 2014).

Embora sejam importantes para a estimativa do IPM, estas moscas são as principais causadoras de miíases, sendo então úteis na área forense principalmente no que diz respeito às situações de negligência (Huffman e Wallace, 2012). São espécies que são mais atraídas por tecidos animais frescos e, Europa e Ásia são os continentes onde estas moscas são mais frequentes (Reichholf-Riehm, 1990).

Lucilia caesar, *Lucilia sericata*, *Lucilia eximia* e *Lucilia illustris* são as espécies deste género que estão incluídas na chave pictórica.

1.2.2.3 Género *Chrysomya*

As principais características distintivas deste género são a existência de olhos compostos avermelhados de grandes dimensões e o fato de possuírem pêlos na veia-tronco da asa e na *greater ampulla* (Byrd e Castner, 2010; Cainé, 2010). Combinando características dos géneros *Calliphora* e *Lucilia*, estes dípteros podem apresentar tons de verde como de azul metálico no seu abdómen (Gennard, 2012).

As espécies com maior importância forense neste género incluem *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819). Os adultos possuem cerca de 5-12mm de comprimento e as espécies são distinguidas principalmente pela variação nas cores do espiráculo e também de algumas estruturas da cabeça (Gennard, 2012; Oliveira-Costa, 2013).

Para além de matéria orgânica em decomposição, estas espécies são também atraídas por odores adocicados e excrementos, líquidos ou sólidos (Cainé, 2010).

Na chave pictórica este género está representado apenas pela espécie *Chrysomya albiceps*, uma vez que é a espécie mais abundante em Portugal.

1.2.2.4 Género *Pollenia*

As moscas do género *Pollenia* fogem um pouco do padrão, em termos de morfologia, das outras moscas da família Calliphoridae, na medida em que não apresentam o corpo com coloração em tons metálicos. No entanto são relativamente fáceis de identificar uma vez que apresentam cerdas no katepimeron (característica chave da família Calliphoridae), e possuem uma grande quantidade de cerdas amarelas no tórax, muito características e distintivas deste género (Whitworth, 2010).

Dentro do género já se torna bastante difícil separar as espécies, sendo *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794) a mais abundante e, portanto, é a única espécie deste género representada na chave pictórica.

1.3 Entomologia Forense em Portugal

Sendo a EF uma ciência que permite obter diversos parâmetros em casos legais, revelando-se um bom complemento às investigações criminais, é de elevada importância o estudo continuado das espécies forenses mais importantes em Portugal e o desenvolvimento de técnicas e ferramentas que facilitem cada vez mais a sua identificação.

Em Portugal, não existiam qualquer tipo de estudos relacionados com as principais espécies entomológicas forenses até ao ano de 2008. Foi neste mesmo ano que se fizeram os estudos pioneiros relacionados com a EF em Portugal, integrados nas teses de mestrado de Gusmão (2008) e Marques (2008), da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Muitos outros estudos acerca deste assunto se desenvolveram a partir daí (Cainé, 2010; Centeio, 2011; Ferreira *et al*, 2011; Oliveira *et al*, 2011; Prado e Castro, 2011; Lopes 2012; Prado e Castro *et al*, 2012; Fernandes, 2013; Rolo *et al*, 2013; Farinha *et al*, 2014), tanto no diz respeito à morfologia e sucessão das espécies que colonizam o cadáver quanto à sua identificação através de métodos moleculares (Rebello *et al*, 2014).

Embora a EF já faça parte do plano curricular de diversos cursos em vários estabelecimentos de ensino em Portugal (Rebello *et al*, 2014), não há grande utilização desta ciência pelos técnicos forenses devido a ainda existir uma falta de informação acerca da bioecologia das espécies ou até mesmo por ainda não haver uma forma rápida e eficaz de identificação destes insetos. É este tipo de problemas que se pretende resolver através deste projeto, que foi realizado no âmbito do mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, de forma a enriquecer o ainda pouco conhecimento que existe acerca desta área em Portugal e incentivar o uso da EF, em investigações criminais, para a determinação dos vários parâmetros já referidos.

Assim sendo, nesta chave pictórica serão descritas as características morfológicas diagnosticantes das espécies da família Calliphoridae com maior importância forense em Portugal, nomeadamente *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps*

(Wiedemann, 1819), *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794).

1.4 Importância da chave de identificação

As identificações das espécies através de análises moleculares têm vindo a ganhar cada vez mais destaque embora, quando comparadas com as identificações morfológicas, ainda sejam tarefas mais complexas e dispendiosas (Rocheft et al, 2015).

Os grandes problemas na identificação morfológica das espécies de Diptera assentam principalmente na falta de taxonomistas e de ferramentas ou chaves de identificação que consigam identificar até as espécies mais comuns, problemas esses que resultam muitas vezes em identificações erradas das espécies. A identificação correta é fundamental para que, por um lado, o IPM seja calculado com a maior precisão possível, já que diferentes espécies têm taxas de desenvolvimento diferentes e também têm preferência por diferentes estados da decomposição. Por outro lado, essa identificação correta é importante também para que a deslocação do cadáver seja corretamente determinada (Carvalho e Mello-Patiu, 2008; Amendt et al, 2010; Ubero-Pascal et al, 2010).

As chaves de identificação convencionais ainda são as mais utilizadas hoje em dia, embora possam suscitar mais dúvidas, erros de identificação e por vezes não sejam muito precisas na identificação de espécies. Entre as principais vantagens das chaves interativas encontram-se a sua flexibilidade, a facilidade de ser atualizada e utilizada e a utilização de imagens que facilitam a identificação das estruturas morfológicas (Dallwitz et al, 2013).

Tendo em vista a resolução destes problemas, o principal objetivo deste trabalho foi construir uma chave pictórica, disponível e acessível a toda a comunidade científica, com as espécies forenses mais importantes em Portugal.

MATERIAL E MÉTODOS



2. Material e Métodos

2.1 Recolha do material

Os insetos utilizados neste estudo foram previamente recolhidos e identificados no âmbito da tese de mestrado de Gusmão (2008). Estes foram capturados diretamente a partir de cadáveres de diversas espécies de animais, na Serra da Estrela: Geneta, *Genetta genetta* (Linnaeus, 1758), Raposa, *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758), Águia-de-asa-redonda, *Buteo buteo* (Linnaeus, 1758), Pombo-torcaz, *Columba palumbus* (Linnaeus, 1758), Pombo doméstico, *Columba livia* (Gmelin 1789), Coelho bravo, *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus 1758) e Javali, *Sus scrofa* (Linnaeus 1958).

Foram também utilizados insetos recolhidos em armadilhas de isco com carne de porco, fígado de porco e peixe, colocadas em diferentes locais do país (Região de Lisboa, Aroeira e Sertão). Após a recolha, estes insetos foram conservados em frascos com álcool a 70% e devidamente etiquetados (Centeio 2011).

2.2 Montagem e etiquetagem

Após a seleção dos exemplares em melhor estado de conservação, o primeiro passo foi a sua montagem e etiquetagem.

Para montar os insectos foi utilizada a técnica de alfinetagem. Este tipo de montagem, utilizado na maioria dos insetos de tamanho médio e grande, consiste basicamente em espetar verticalmente um alfinete entomológico (que não enferruja por ser de aço) diretamente no tórax do inseto, tendo este que ficar a aproximadamente 1cm abaixo da cabeça do alfinete (Fig. 9A). Dado que a perfuração pode danificar algumas estruturas do corpo do inseto, esta deve ser feita no lado direito do tórax do exemplar, mantendo o outro lado intacto (Fig. 9B) (Almeida *et al*, 1998). Após a alfinetagem principal, deve-se ajustar as patas, asas e antenas com a ajuda de outros alfinetes, de modo a que estes apêndices fiquem numa posição relativamente fácil de observar, e deixa-se o exemplar secar dentro de uma caixa entomológica.

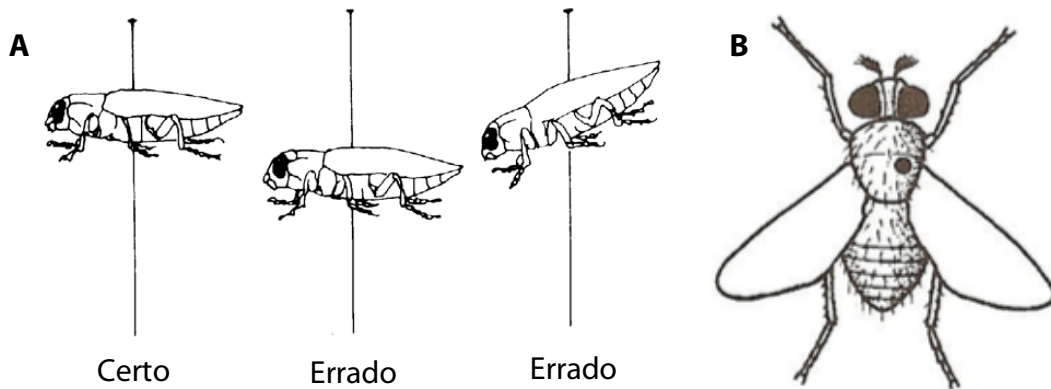


Fig. 9 A – Posição correta em que os insetos devem ficar após a alfinetagem (Figura adaptada de University of Minnesota). **B** – Local de alfinetagem, deslocado ligeiramente para a direita (Figura adaptada de Almeida *et al.* (1998)).

Após a montagem foi efetuada a respectiva etiquetagem dos insetos (Fig. 10), que deve conter toda a informação possível acerca do exemplar e das condições de captura.

A etiquetagem dos exemplares é um passo importante uma vez que, caso estes sejam utilizados para outros estudos, é fundamental que as respectivas identificações estejam corretas. É também importante registar outras informações, como por exemplo as condições e local de captura, para que futuramente seja mais fácil capturar indivíduos da mesma espécie.



Fig. 10 Exemplares devidamente alfinetados e etiquetados (Fotografia do autor).

2.3 Seleção das características

A selecção das características diagnosticantes das várias espécies incluídas na chave foi baseada principalmente nos trabalhos de Byrd e Castner (2010), Centeio (2011), Spzila (2012) e Akbarzadeh *et al.* (2015).

2.4 Fotografia e construção da chave

Após a selecção das características diagnosticantes, os exemplares foram analisados e fotografados através de microscopia ótica, com a ajuda de um microscópio de modelo Olympus SZX7 (Fig. 11). A fotografia das estruturas morfológicas foi conseguida através de uma câmara digital de modelo Olympus SC30, acoplada ao microscópio anteriormente referido. Posteriormente, a análise e o processamento das imagens digitais foram conseguidos através do software Lab Sens (versão 1.1).

Numa fase final, a construção da chave com as imagens obtidas foi elaborada tendo como base as chaves referidas no ponto anterior.



Fig. 11 Microscópio utilizado para a análise e fotografia dos exemplares (Modelo Olympus SZX7) (Figura adaptada de Microscope Central).

2.5 Construção do website

Um dos objetivos principais do projeto foi o de disponibilizar a chave interativa online, para que esta esteja acessível e possa ser utilizada pelo maior número de pessoas possível, também numa tentativa de fomentar a utilização da EF em Portugal. Para isso, foi criado um website utilizando a plataforma Weebly.

O resultado final obtido encontra-se no capítulo dos Resultados.

RESULTADOS



3. Resultados

3.1 Características chave da família Calliphoridae

Entre as principais características que distinguem a família Calliphoridae de outras famílias de Diptera estão: calípteras bem desenvolvidas (Fig. 12A), coloração do abdômen, na maior parte das vezes, azul metálico (Fig. 12A) ou verde metálico (Fig. 12B), presença de uma linha de cerdas no meron (Fig. 12C), existência de apenas duas cerdas na notopleura (Fig. 12D), arista plumosa (Fig. 12E) e o fato da veia M ser curvada fortemente, levando ao estreitamento da célula r4+5 (Fig. 12F).

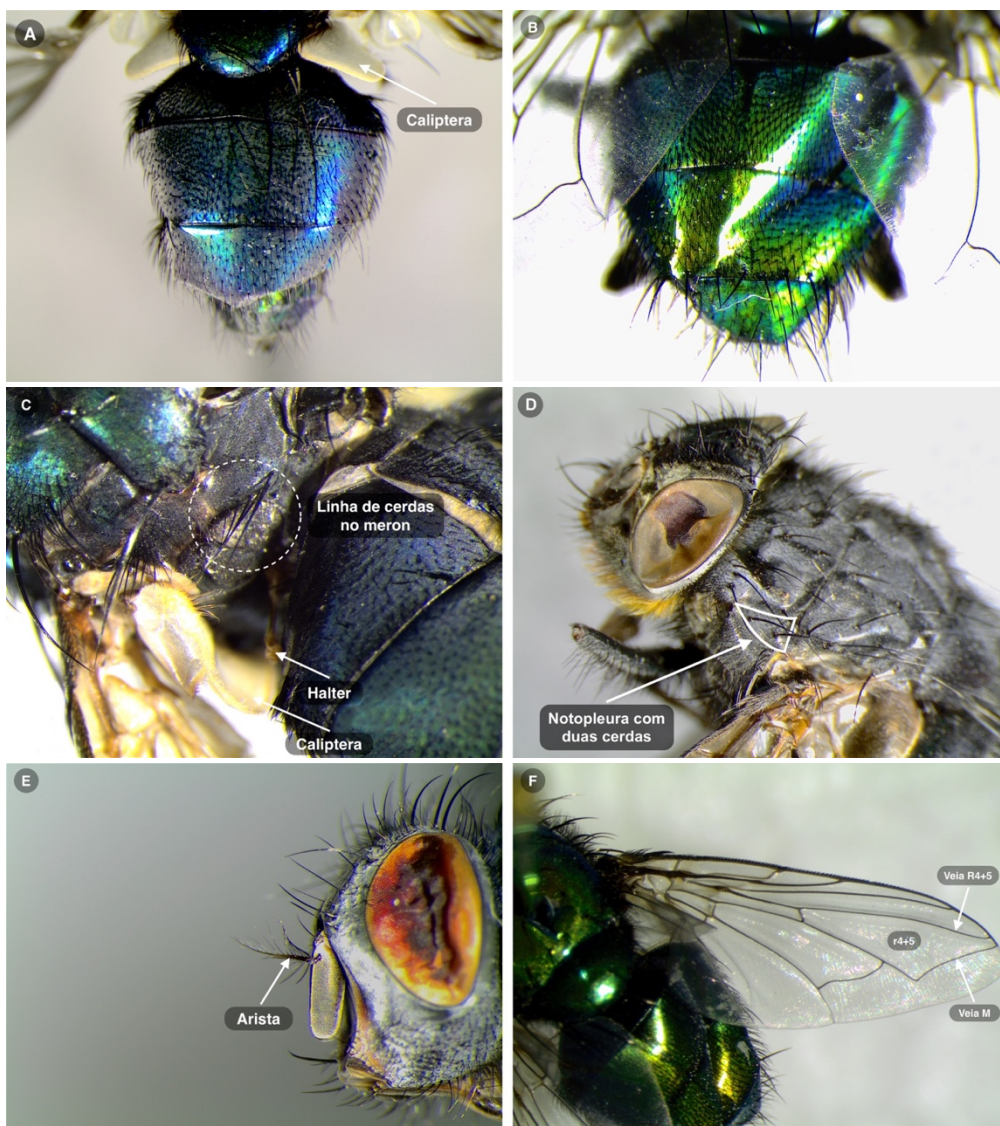
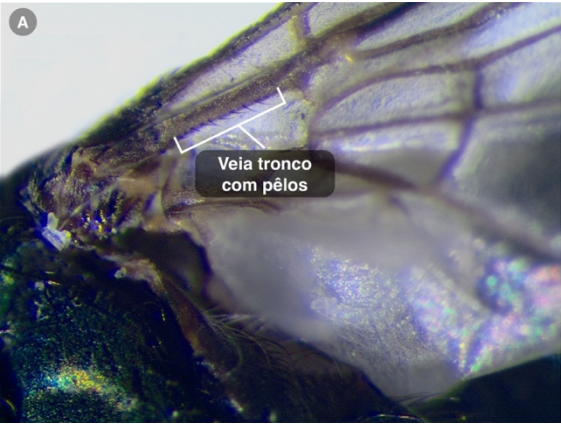


Fig. 12 Características chave da família Calliphoridae. **A** – Calípteras de grandes dimensões e abdômen azul metálico; **B** – Abdômen verde metálico; **C** – Localização da linha de cerdas, no meron; **D** – Localização da notopleura, com duas cerdas; **E** – Localização da arista plumosa; **F** – Localização das veias M (curvada) e R4+5 e da célula r4+5.

3.2 Chave pictórica


Segue-se a chave com o registo fotográfico das características morfológicas diagnosticantes e respectivas indicações das seguintes espécies da família Calliphoridae: *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794).

1	Veia tronco da asa com linha de pêlos (Fig. 13A) [Chrysomyinae]	2
	Veia tronco da asa sem pêlos (Fig. 13B)	8



A

Veia tronco com pêlos

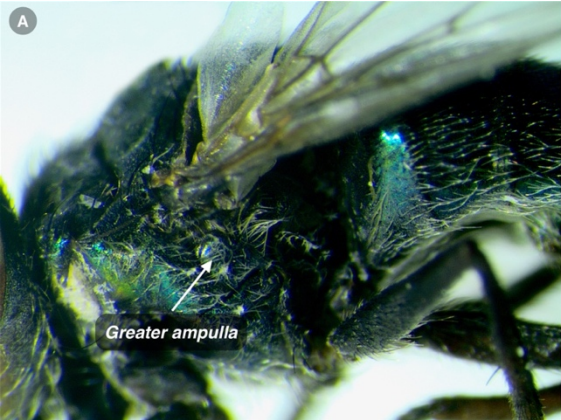


B

Veia tronco sem pêlos

Fig. 13 Localização da veia tronco. **A** - Presença de pêlos; **B** - Ausência de pêlos.

2 (1)	<i>Greater ampulla</i> coberta com pêlos (Fig. 14A) [Chrysomya spp.]	3
	<i>Greater ampulla</i> sem pêlos (Fig. 14B)	<i>Phormia</i> spp. ou <i>Protophormia</i> spp.



A

Greater ampulla



B

Greater ampulla

Fig. 14 Localização da *greater ampulla*. **A** - Presença de pêlos; **B** - Ausência de pêlos.

3 (2)	Espiráculo anterior de cor clara (Fig. 15A)	4
	Espiráculo anterior de cor escura (Fig. 15B)	<i>Chrysomya</i> spp.

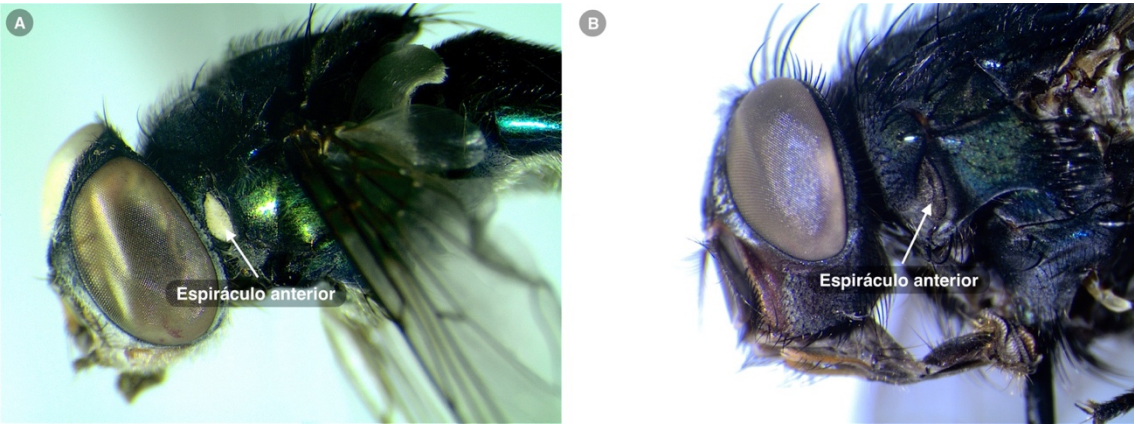


Fig. 15 Localização do espiráculo anterior, no tórax. **A** - Coloração clara; **B** - Coloração escura.

4 (3)	Margem anterior da asa transparente (Fig. 16)	5
	Margem anterior da asa escurecida (Fig. 34, em anexo)	<i>Chrysomya</i> spp.



Fig. 16 Localização da margem anterior da asa, transparente.

5 (4)	Pêlos brancos no 5º tergito (T5) abdominal (Fig. 17A)	6
	Pêlos negros no 5º tergito (T5) abdominal (Fig. 17B)	<i>Chrysomya</i> spp.

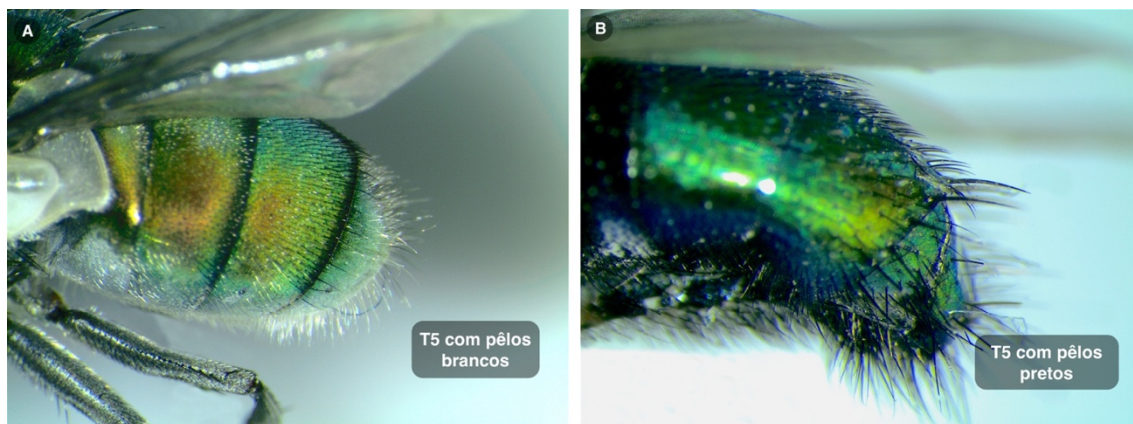


Fig. 17 Presença de pêlos no 5º tergito abdominal (T5). **A** - Pêlos brancos; **B** - Pêlos pretos.

6 (5)	Riscas pretas transversais nos segmentos abdominais III e IV (Fig. 18)	7
	Riscas pretas transversais apenas no segmento abdominal III	<i>Chrysomya</i> spp.



Fig. 18 Localização das riscas pretas transversais nos segmentos abdominais III e IV.

7 (6)	3º segmento da antena de coloração escura (Fig. 19A)	<i>Chrysomya albiceps</i>
	3º segmento da antena de coloração alaranjada (Fig. 19B)	<i>Chrysomya</i> spp.

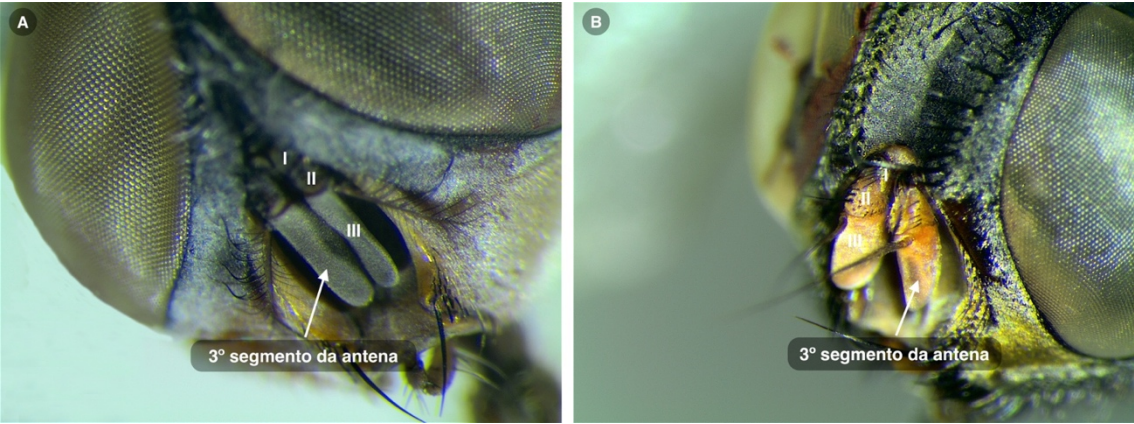


Fig. 19 Localização dos 3 segmentos da antena. **A** - 3º segmento com coloração escura; **B** - 3º segmento com coloração alaranjada.

8 (1)	Ausência de pêlos amarelos; Moscas com reflexos de cores metálicas (normalmente verde ou azul) (Fig. 20A)	9
	Pêlos amarelos para além das cerdas normais da mosca; Moscas de coloração escura, sem reflexos de cores metálicas [Polleniae] (Fig. 20B)	19



Fig. 20 Vista lateral. **A** - Ausência de pêlos amarelos; Mosca com coloração em tons de verde metálico; **B** - Presença de pêlos amarelos; Mosca com coloração escura.

9 (8)	Calípteras inferiores com pêlos (Fig. 21A); Tórax de coloração escura e não metálica [Calliphorinae]	10
	Calípteras inferiores sem pêlos (Fig. 21B); Tórax normalmente com reflexos de cor verde metálico [Luciliinae]	12

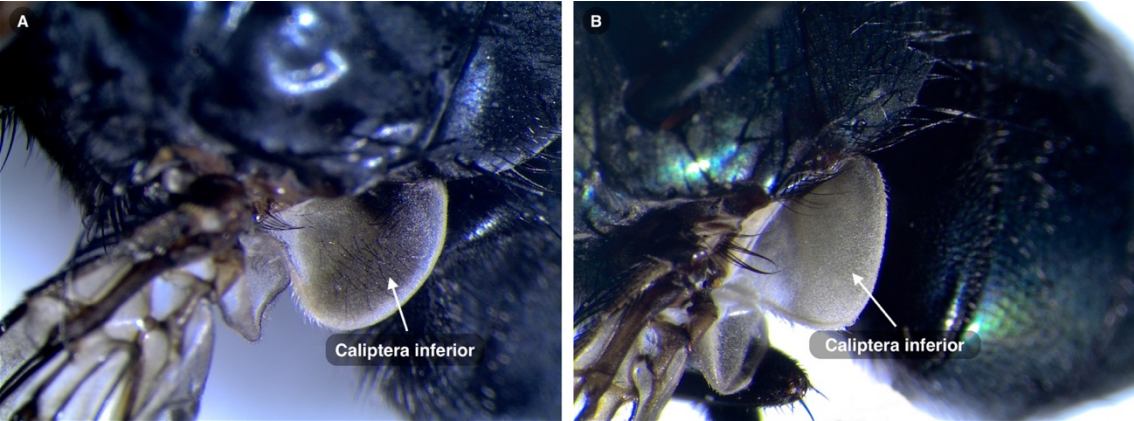


Fig. 21 Localização das calípteras inferiores. **A** - Calípteras com pêlos; **B** - Calípteras sem pêlos.

10 (9)	Presença de 3 pares de cerdas acrosticais no tórax (Fig. 22A) [Calliphora spp.]	11
	Presença de apenas 1 par de cerdas acrosticais no tórax (Fig. 35, em anexo) <i>Cynomya</i> spp.	

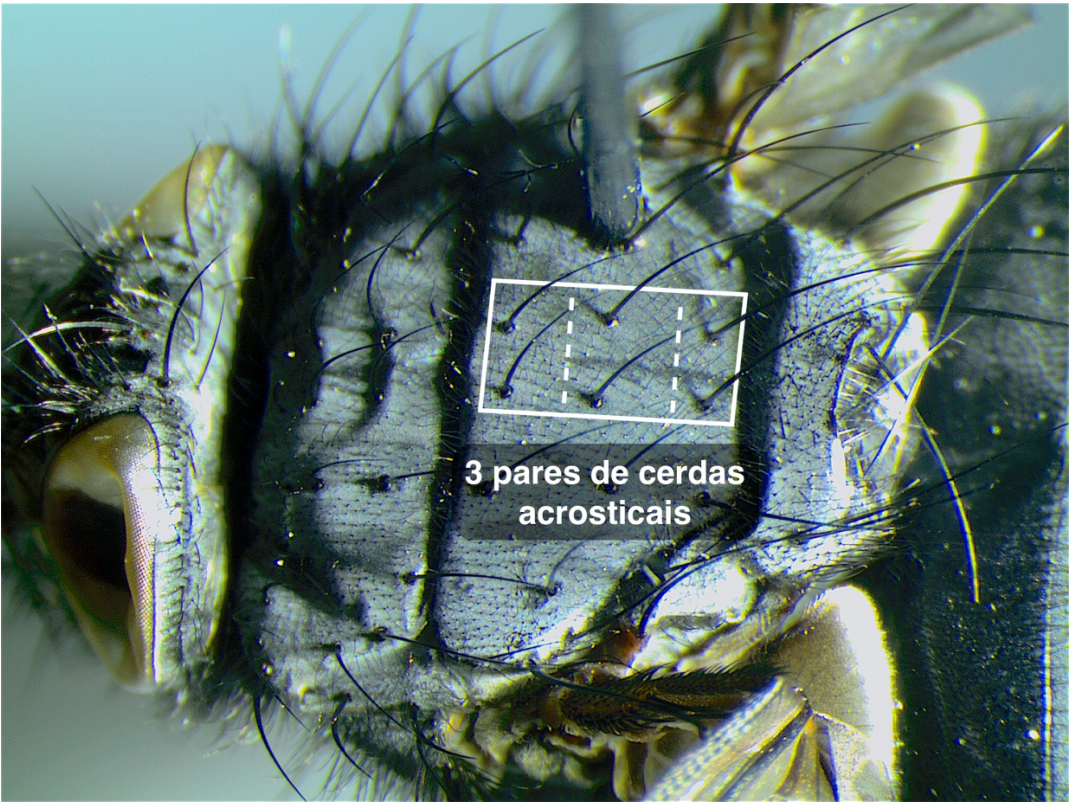


Fig. 22 Localização dos 3 pares de cerdas acrosticais, no tórax.

11 (10)	Bucca laranja e espiráculo anterior amarelo (Fig. 23A); Basicosta amarela (Fig. 24A)	<i>Calliphora vicina</i>
	Bucca negra e espiráculo anterior escuro (Fig. 23B); Basicosta negra (Fig. 24B)	<i>Calliphora vomitoria</i>



Fig. 23 Localização da *bucca*, na cabeça, e do espiráculo anterior, no tórax. **A** - *Bucca* laranja e espiráculo anterior amarelo; **B** - *Bucca* negra e espiráculo anterior escuro.

12 (9)	Basicosta de coloração amarela (Fig. 24A)	13
	Basicosta de coloração negra (Fig. 24B)	14

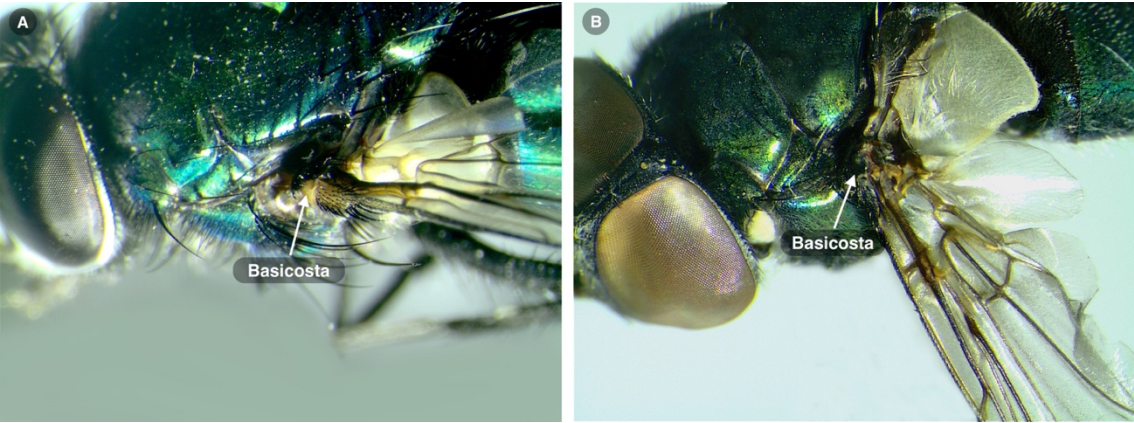


Fig. 24 Localização da basicosta, na margem costal da asa. **A** - Basicosta amarela; **B** - Basicosta negra.

13 (12)	Presença de 2 pares de cerdas acrosticais (Fig. 25A); Palpos de coloração amarela (Fig. 26A)	15
	Presença de 3 pares de cerdas acrosticais (Fig. 25B); Palpos de coloração escura (Fig. 26B)	<i>Lucilia</i> spp.

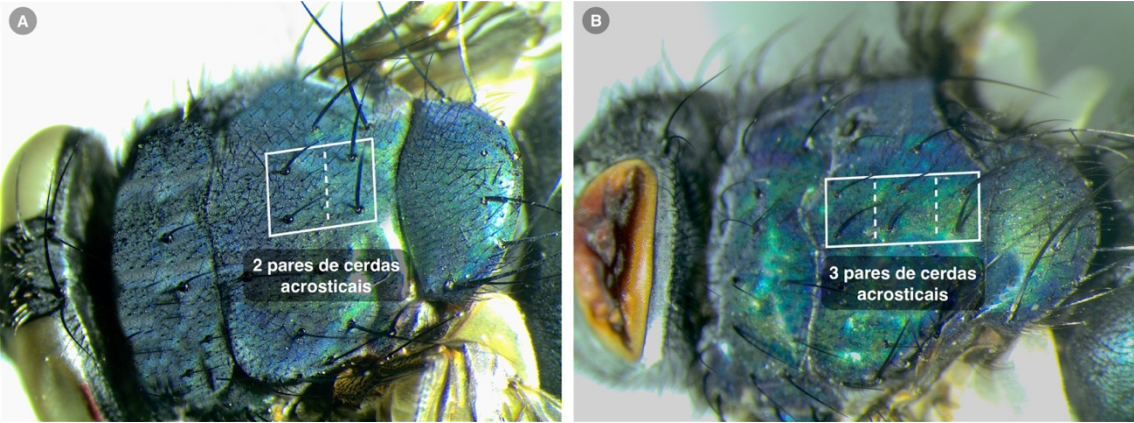


Fig. 25 Localização das cerdas acrosticais, no tórax. **A** - 2 pares de cerdas; **B** - 3 pares de cerdas.



Fig. 26 Localização dos palpos, na cabeça. **A** - Coloração amarela; **B** - Coloração escura.

14 (12)	Declive posterior do calo umeral com 6-8 pêlos (Fig. 27A)	<i>Lucilia sericata</i>
	Declive posterior do calo umeral com 0-4 pêlos (Fig. 27B)	<i>Lucilia</i> spp.



Fig. 27 Localização do calo umeral. **A** - Declive posterior com 7 pêlos; **B** - Declive posterior sem pêlos.

15 (13)	Risca coxopleural ausente	16
	Risca coxopleural presente (Fig. 28)	17

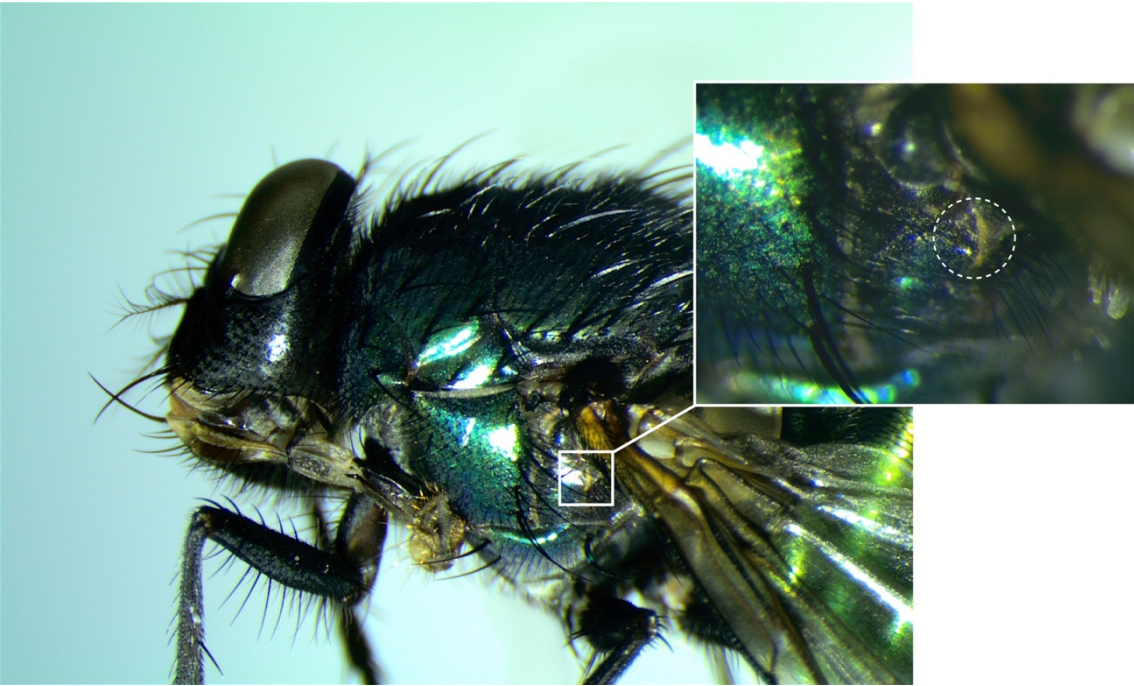


Fig. 28 Localização da risca coxopleural.

16 (15)	Calípteras de coloração branca ou castanho claro (Fig. 29A); Tíbia negra (Fig. 29B) e corpo normalmente de coloração verde	<i>Lucilia ampullacea</i>
	Calípteras de coloração castanha; Tíbia alaranjada e corpo normalmente de coloração azul/púrpura	<i>Lucilia</i> spp.

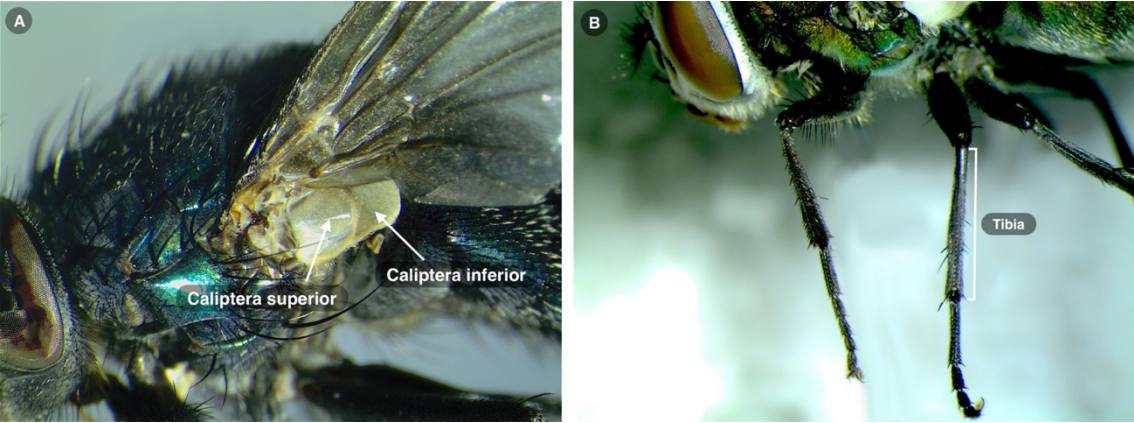


Fig. 29 A - Localização das calípteras; **B** - Localização da tíbia.

17 (15)	Calípteras de coloração branca (Fig. 30A); Riscas pretas transversais nos segmentos abdominais III e IV (Fig. 18)	18
	Calípteras de coloração castanha (Fig. 30B); Riscas pretas transversais nos segmentos abdominais III e IV (Fig. 18)	<i>Lucilia</i> spp.

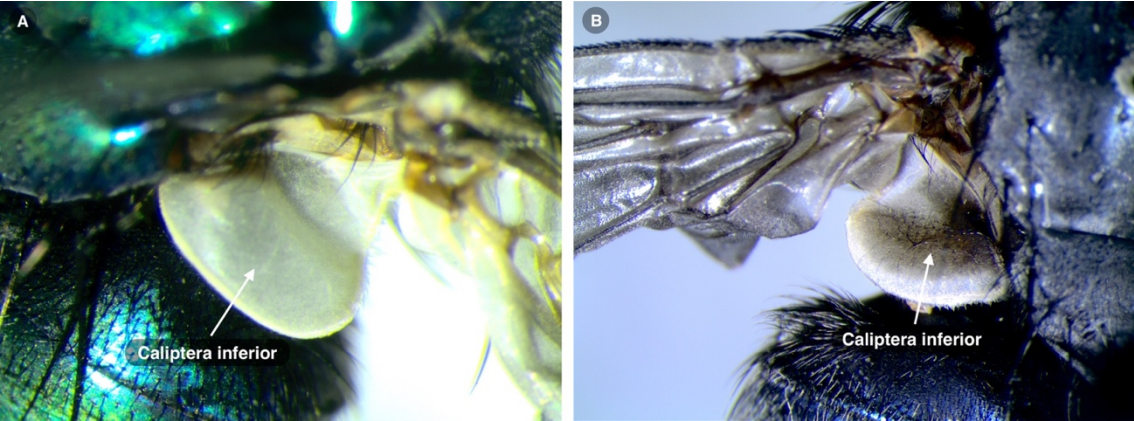


Fig. 30 Localização das calípteras, debaixo das asas. **A** - Coloração branca; **B** - Coloração castanha.

18 (17)	Fêmea: 6º tergito abdominal (T6) convexo em vista lateral (Fig. 31A)	<i>Lucilia caesar</i>
	Fêmea: 6º tergito abdominal (T6) reto em vista lateral (Fig. 31B)	<i>Lucilia illustris</i>

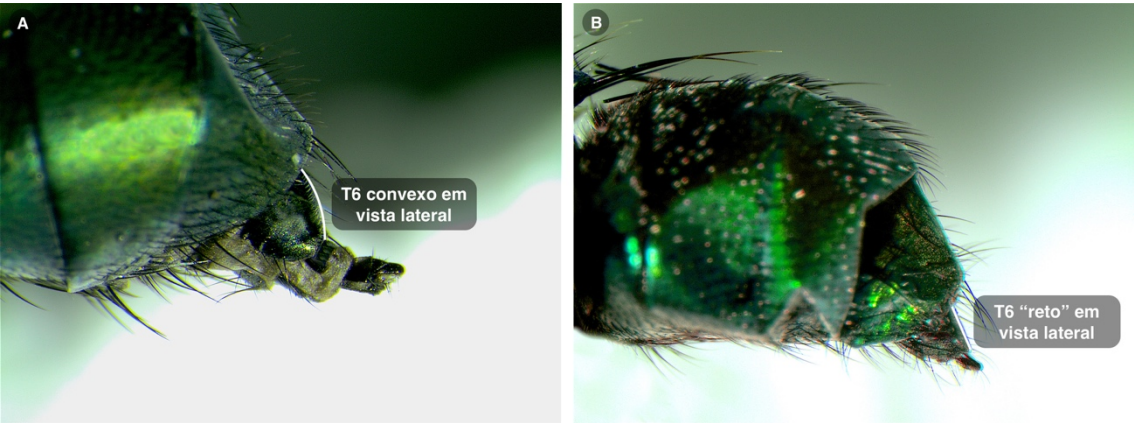


Fig. 31 Vista lateral do aparelho reprodutor, no abdômen. **A** - T6 convexo; **B** - T6 reto.

19 (8)	Fêmures medianos e posteriores apenas com cerdas negras na região postero-ventral (Fig 31A); Vestidura abdominal ventral densa e predominantemente de coloração negra (Fig. 32B)	<i>Pollenia rudis</i>
	Fêmures medianos e posteriores com algumas cerdas amarelas na região postero-ventral; Vestidura abdominal ventral pouco densa e com algumas cerdas de coloração amarela.	<i>Pollenia</i> spp.



Fig. 32 A - Localização do fémur, na pata; **B** - Localização da região ventral abdominal, com vestidura densa e pedominantemente de coloração escura.

3.3 Website

O website encontra-se disponível em “www.calliphoridaekey.weebly.com”, no qual é possível encontrar todos os resultados obtidos nesta tese, incluindo a chave interativa e alguma informação introdutória acerca da família Calliphoridae e da EF em geral (Fig. 33).

O website foi disponibilizado em língua inglesa uma vez que é a língua científica oficial em todo o mundo, estando deste modo a informação nele contida acessível a um maior número de pessoas.

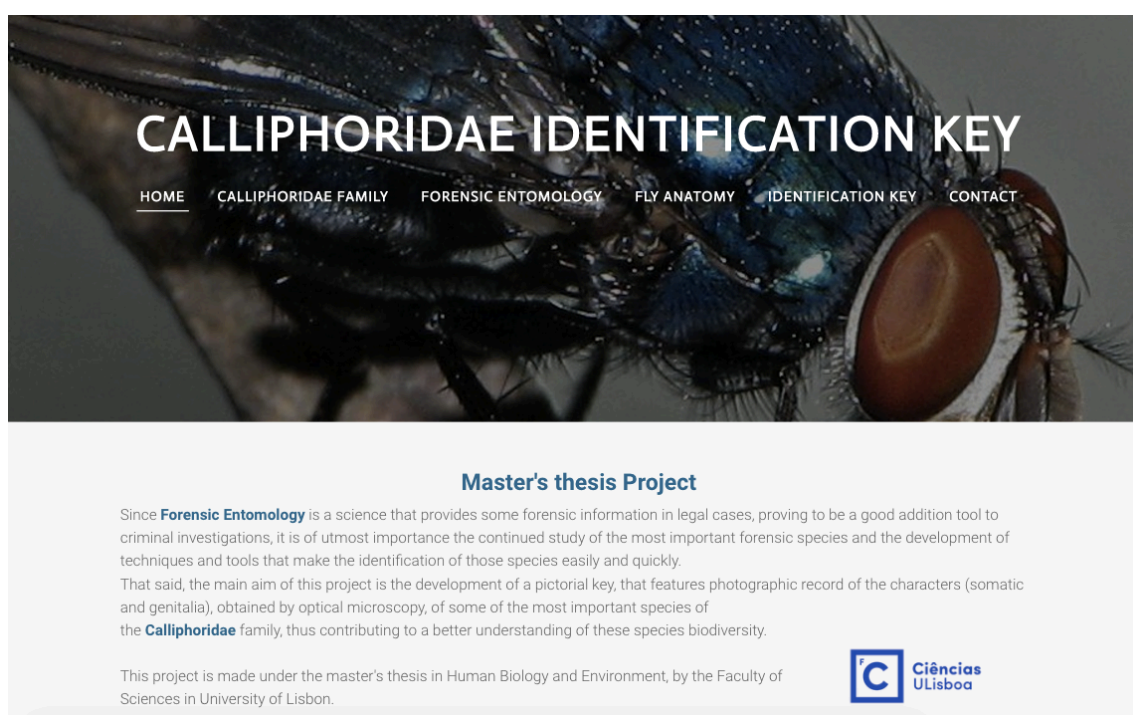


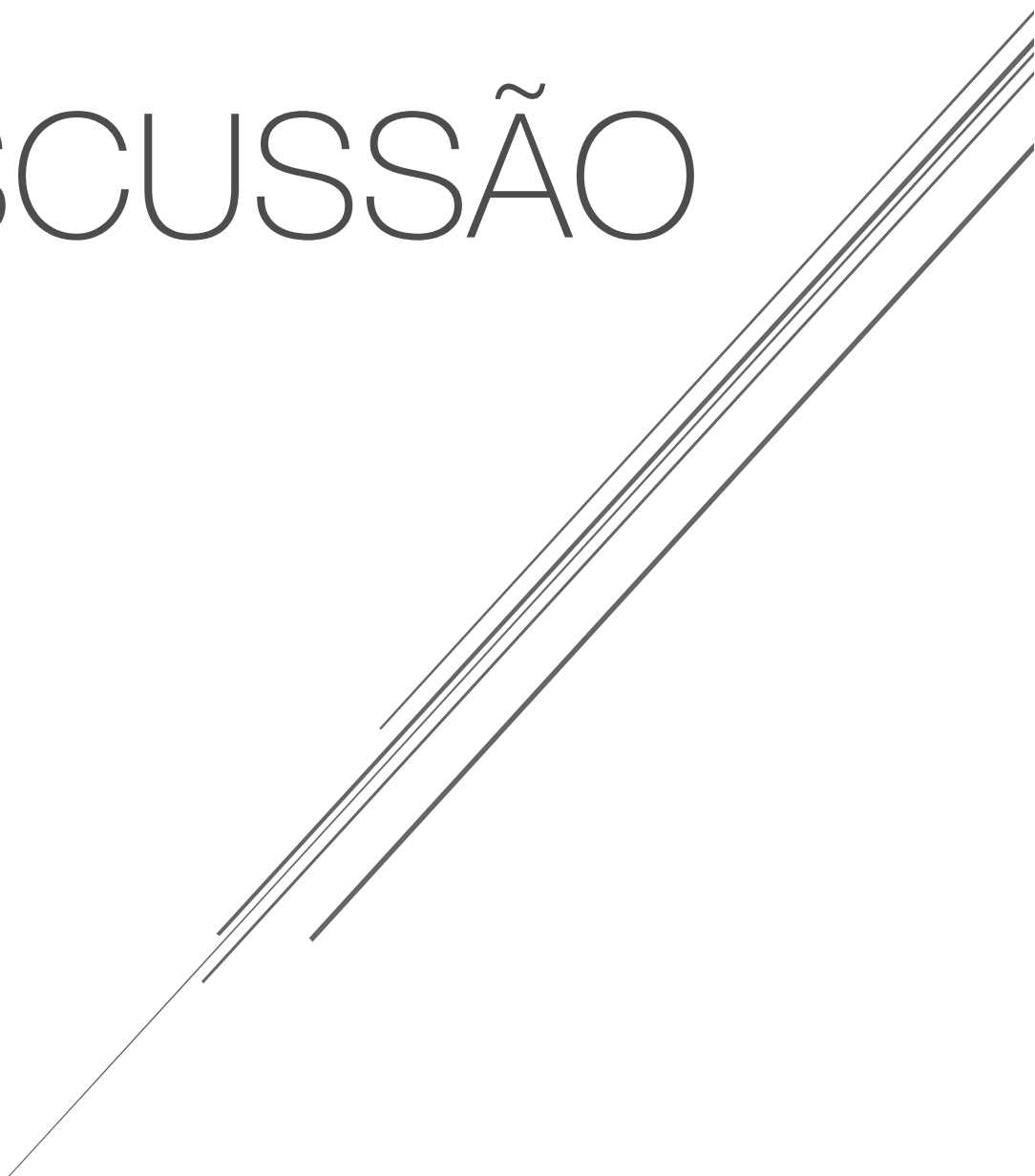
Fig. 33 Visão geral da página inicial do website.

Website: www.calliphoridaekey.weebly.com



Código QR

DISCUSSÃO



4. Discussão

Esta chave, construída com o auxílio de imagens fotografadas através de microscopia ótica, permite a identificação de oito espécies da família Calliphoridae, distribuídas pelos géneros *Calliphora*, *Lucilia*, *Chrysomya* e *Pollenia*, existentes em Portugal.

A primeira característica que permite separar logo a subfamília Chrysomyinae das restantes é a presença de uma linha de pêlos na veia tronco da asa (Fig. 13). De seguida, para separar o género *Chrysomya* dos géneros *Phormia* e *Protophormia* deve-se verificar a existência ou não de pêlos na *greater ampulla* (Fig. 14). Caso estes existam, estamos na presença de um exemplar do género *Chrysomya*. Para se chegar à identificação da espécie *Chrysomya albiceps*, a única espécie deste género incluída na chave, deve-se analisar características como a coloração do espiráculo (Fig. 15), a margem anterior da asa (Fig. 16), a coloração dos pêlos abdominais (Fig. 17), a presença de riscas pretas transversais no abdómen (Fig. 18) e a coloração do 3º segmento da antena (Fig. 19).

O género *Pollenia* é facilmente separado dos restantes uma vez que apresenta características muito distintas como a coloração escura e não metálica e a presença de cerdas amarelas para além das cerdas normais da mosca (Fig. 20). Para a identificação da espécie *Pollenia rudis* deve-se ter em conta a coloração das cerdas presentes nos fémures e a densidade e coloração da vestidura abdominal (Fig. 32).

Os géneros *Calliphora* e *Lucilia* são separados pela presença (*Calliphora*) ou ausência (*Lucilia*) de pêlos nas calípteras inferiores e também pela coloração do tórax e abdómen, sendo escura e não metálica nos *Calliphora* e com reflexos de cor verde nos *Lucilia* (Fig. 21).

O género *Calliphora* distingue-se do género *Cynomya* pela presença de três pares de cerdas acrosticais, em vez de apenas um (Fig. 22). Já as espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria* são facilmente distinguidas pela coloração da *bucca*, do espiráculo anterior e da basicosta (Fig. 23-24).

Do género *Lucilia* estão incluídas quatro espécies. A espécie *Lucilia sericata*, para além de apresentar as características diagnosticantes do género já referidas, é ainda caracterizada e distinguida por possuir a basicosta de coloração negra (Fig. 24B)

e por apresentar o declive posterior do calo umeral com 6-8 pêlos (Fig. 27A). Ao contrário desta, a espécie *Lucilia ampullacea* apresenta coloração amarela na basicosta (Fig. 24A) e distingue-se de outras espécies do género através de características como a quantidade de cerdas acrosticais e coloração dos palpos (Fig. 26), ausência de risco coxopleural (Fig. 28) e através da coloração das calípteras, tibia e do corpo em geral (Fig. 29). Por fim, para identificar as espécies *Lucilia caesar* e *Lucilia illustris*, para além de todas as características já referidas, há que analisar a coloração das calípteras (Fig. 30), a presença de riscas pretas transversais nos segmentos abdominais III e IV (Fig. 18) e o 6º tergito abdominal das fêmeas, que é convexo em vista lateral em *Lucilia caesar* e reto em *Lucilia illustris* (Fig. 31).

Em termos de identificação, é relativamente fácil chegar à família, ao género e à maior parte das espécies com a ajuda desta chave. A maior dificuldade prender-se-á na distinção entre as espécies *Lucilia illustris* e *Lucilia caesar* uma vez que é necessária a observação e análise de estruturas reprodutoras, que se demonstram mais difíceis de identificar. Note-se que mesmo a distinção molecular destas espécies também se revela de grande dificuldade (Oliveira *et al*, 2011).

CONCLUSÃO



5. Conclusão

A Entomologia forense tem um grande potencial para se revelar uma boa ferramenta complementar às investigações forenses. No entanto, em Portugal, esta é uma área que ainda é pouco estudada e aplicada.

Com a criação desta chave pictórica, que contém oito espécies (*Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794) espera-se facilitar a identificação destes exemplares pelos técnicos forenses e outros investigadores não especialistas em Calliphoridae.

Embora o foco deste trabalho seja a área forense, é esperado que a chave desenvolvida seja útil também para outras áreas e que contribua para o conhecimento da biodiversidade destas espécies.

Dados os poucos estudos acerca destas espécies e do seu comportamento em Portugal, é importante a continuação da realização de mais estudos de forma a amplificar o conhecimento relativamente às espécies de insetos que colonizam os cadáveres.

BIBLIOGRAFIA



6. Bibliografia

- Akbarzadeh K, Wallman JF, Sulakova H, Szpila K. 2015. Species identification of Middle Eastern blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. *Parasitology Research* 114: 1463-1472.
- Almeida LM, Rbeiro-Costa CS; Marinoni L. 1998. Manual de Coleta, Conservação, Montagem e Identificação de Insetos. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJR. 2007. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine* 121: 90-104.
- Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M. 2010. *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer.
- Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJR. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine and Pathology* 7(4): 379-392.
- Benecke M. 2001. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International* 120: 2-14.
- Benecke M. 2004. *Forensic Entomology: Arthropods and Corpses*. In: Tsokos M (ed.) *Forensic Pathology Reviews*, vol. 2. Humana Press Inc.
- Bornemissza GF. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology* 5: 1-12.
- Byrd JH, Castner JL. 2010. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, second edition. CRC Press.
- Cainé L, Corte Real F, Lima G, Pontes L, Abrantes D, Pinheiro MF. 2006. Genetic identification of forensically important Calliphoridae in Portugal. *International Congress Series* 1288: 846-848.
- Cainé L. 2010. Entomologia forense: identificação genética de espécies em Portugal. Ph.D. dissertation, Universidade de Coimbra.
- Carvalho C, Mello-Patiu C. 2008. Key to the Adults of the Most common Forensic Species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia* 52(3): 390-406.
- Carvalho L, Thyssen P, Linhares A, Palhares F. 2000. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 135-138.
- Catts E, Goff M. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology* 37: 253-272.
- Centeio N. 2011. Entomologia forense da vida selvagem: morfologia comparada de estádios imaturos e adultos de Calliphoridae recolhidos em cadáveres de fauna selvagem. Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental, FCUL.
- Cooper JE, Cooper ME. 2007. *Introduction to Veterinary and Comparative Forensic Medicine*, first edition. Blackwell publishing.
- Cruz AM. 2006. Medico-Legal Process, pp. 10-13. In *Crime Scene Intelligence: Na Experiment in Forensic Entomology*. NDIC Press.
- Dallwitz M, Paine T, Zurcher E. 2013. Principles of Interactive Keys. www.delta-intkey.com/www/interactivekeys.htm [Acedida em: 20/08/2016].
- Farinha A, Dourado CG, Centeio N, Oliveira AR, Dias D, Rebelo MT. 2014. Small bait traps as accurate predictors of dipteran early colonizers in forensic studies.

- Journal of Insect Science* 14(77): 1-16.
- Fernandes A. 2013. The influence of nutrition on the morphology of the adult body and the eye of the blowfly, *Calliphora vicina*. Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento, FCUL.
- Ferreira S, Oliveira AR, Farinha A, Rebelo MT, Dias D. 2011. Forensic entomology: nuclear and mitochondrial markers for Diptera and Coleoptera identification. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3: e174-e175.
- Gaensslen ER. 2009. *Blood, Bugs, and Plants*. Infobase Publishing: Facts on File, Inc.
- Gennard D. 2012. *Forensic Entomology: An Introduction*, vol. 2. Wiley- Blackwell publishing.
- Gomes L. 2010. *Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais*, 1ª edição. Technical Books Editora.
- González P. 1997. Los Insectos y la muerte. *Los Artrópodos y el Hombre* 20: 285- 290.
- Greenberg B, Charles J. 2002. *Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators*, first edition. Cambridge University Press.
- Gullan PJ, Cranston PS. 2014. *The Insects: An Outline of Entomology*, fifth edition. Wiley-Blackwell publishing.
- Gunn A. 2009. *Essential Forensic Biology*, second edition. Wiley-Blackwell Publishing.
- Gusmão J. 2008. Estudo preliminar da sucessão entomológica (com ênfase na ordem Diptera) em diferentes cadáveres de animais selvagens na Serra da Estrela. Mestrado em Biologia da Conservação, FCUL.
- Huffman JE, Wallace JR. 2012. *Wildlife forensics: methods and applications*. Wiley-Blackwell publishings.
- Jackson ARW, Jackson JM. 2011. *Forensic Science*, third edition. Pearson Education Limited.
- Marques A. 2008. Entomologia forense: análise da entomofauna em cadáver de *Sus scrofa* (Linnaeus), na região de Oeiras, Portugal. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, FCUL.
- Microscope Central. 2016. Olympus SZX7 Fluorescence Stereo Microscope GFP. <http://microscopecentral.com/products/olympus-szx7-fluorescence-stereo-microscope-gfp> [Acedida em: 10/09/2016].
- Oliveira AR, Farinha A, Rebelo MT, Dias D. 2011. Forensic entomology: molecular identification of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Portugal. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3: e439-e440.
- Oliveira-Costa J. 2013. *Insetos "Peritos": A Entomologia Forense no Brasil*, first edition. Millenium Editora.
- Prado e Castro C. 2011. Seasonal carrion Diptera and Coleoptera communities from Lisbon (Portugal) and the utility of forensic entomology in legal medicine. Doutoramento em Biologia (Ecologia), FCUL.
- Prado e Castro C, Serrano A, Martins da Silva P, García MD. 2012. Carrion flies of forensic interest: a study of seasonal community composition and succession in Lisbon, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology* 26(4): 417- 431.
- Rebelo MT, Meireles J, Moreira A, Pereira da Fonseca I. 2014. Entomologia Forense Médico-Veterinária. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 109(591-592): 62-69.
- Reichholf-Riehm H. 1990. Guías de Naturaleza Blume. *Insectos y Arácnidos*. Blume.
- Rivers DB, Dahlem GA. 2014. *The Science of Forensic Entomology*, vol. 1. Wiley-Blackwell.
- Rocheffort S, Giroux M, Savage J, Wheeler T. 2015. Key to forensically important

- piophilidae (Diptera) in the Nearctic region. *Canadian Journal of Arthropod Identification* 27: 1-37.
- Rognes K. 2011. Diptera, Calliphoridae. *Conservazione Habitat Invertebrati* 5: 819-882.
- Rolo EA, Oliveira AR, Dourado CG, Farinha A, Rebelo MT, Dias D. 2013. Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics. *Forensic Science International* 228: 160-164.
- Romana A, Nívea Y, Carvalho R, Reis B, Ribeiro D, Pires A. 2012. A importância da Entomologia forense nas investigações criminais. *VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*.
- Singh J, Sharma BR. 2008. Forensic Entomology: A Supplement to Forensic death investigation. *Journal of Punjab Academy of Forensic Medicine & Toxicology* 8(1): 26-33.
- Smith KGV. 1986. A Manual of Forensic Entomology. Cornell University Press.
- Tarabat W, 2010. *Chrysomya marginalis* (Wiedemann, 1830).
<http://www.pbase.com/wildlifeuae/image/140412874>. [Acedida em: 24/01/2016].
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2007. *Veterinary Parasitology*, third edition. Blackwell publishing.
- Ubero-Pascal N, Arnaldos I, López-Esclapez R, García MD. 2010. Microscopy and forensic entomology. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* 1548-1556.
- University of Minnesota. 2016. Collecting and preserving insects.
<http://www.extension.umn.edu/garden/insects/collecting/> [Acedida em: 19/09/2016].
- Whitworth T. 2010. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy. *Zootaxa* 2663: 1-35.

ANEXOS



7. Anexos

Uma vez que não estavam disponíveis exemplares com as características mencionadas abaixo, importantes para integrar na chave pictórica, seguem-se as fotografias utilizadas de outros autores, com as respectivas fontes em rodapé:

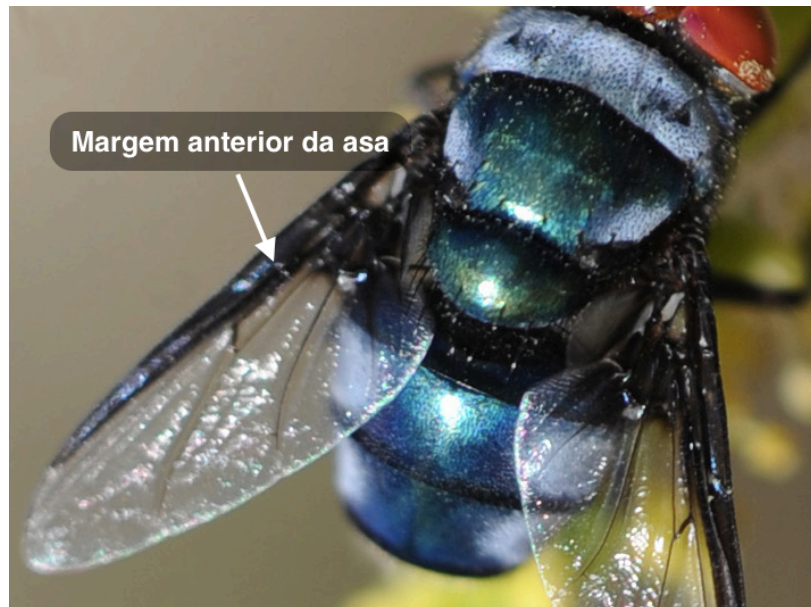


Fig. 34 Localização da margem anterior da asa, escurecida.⁷

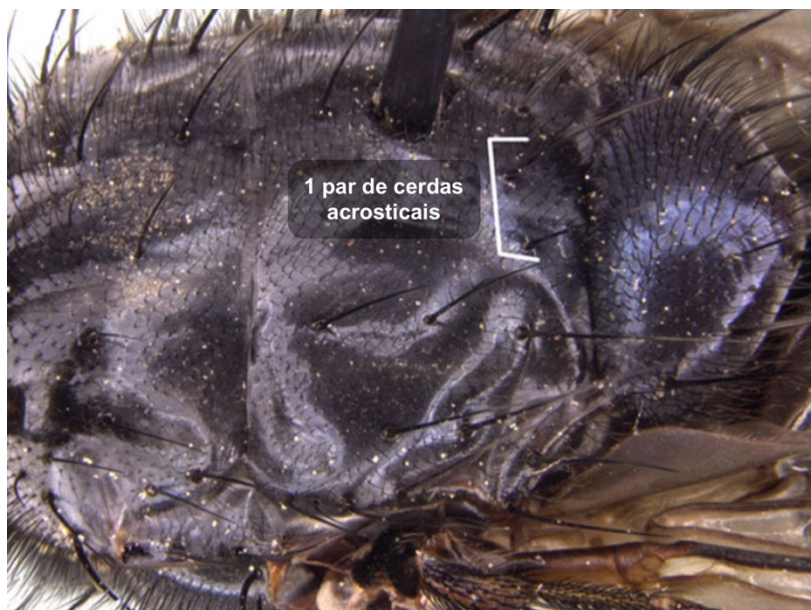


Fig. 35 Localização do único par de cerdas acrosticais, no tórax.⁸

⁷ Fotografia de Tarabat (2010)

⁸ Fotografia de Akbarzadeh *et al* (2015)

Desta dissertação de mestrado resultaram ainda os seguintes trabalhos, submetidos para publicação na revista *Ecologi@*, no âmbito do EBCI⁹ 2015, realizado em Seia:

Artigo:

A Pictorial characterization of Diptera Calliphoridae. A tool for forensic studies

Bruno Dorez^{1,2*}, Inês Fontes^{1*}, Maria T. Rebelo¹

¹ Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

² Email: bruno_miguel.92@hotmail.com

*These authors contributed equally.

Resumo

Os insetos constituem o grupo mais diversificado do planeta Terra, sendo a reciclagem da matéria orgânica uma das suas funções mais subestimadas. Em particular, as vulgarmente conhecidas por moscas varejeiras (Família Calliphoridae) têm ultimamente vindo a despertar o interesse da comunidade científica, principalmente na área das ciências forenses, onde podem ser utilizadas para a determinação de vários parâmetros relacionados com um cadáver, como por exemplo o Intervalo Pós-Morte (IPM), o local do crime, a presença de drogas, entre outras informações relevantes para as investigações criminais.

Em Portugal ainda existem poucos estudos acerca da morfologia destas espécies, tornando a sua identificação uma tarefa mais difícil e demorada. Posto isto, um dos principais objetivos deste projeto será a construção de uma chave interativa, a disponibilizar online, que irá incluir um registo fotográfico das características diagnosticantes (somáticas e genitália) de algumas das espécies mais importantes desta família, nomeadamente *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758). É esperado que esta ferramenta venha trazer uma forma mais fácil e intuitiva de identificar as espécies referidas, contribuindo deste modo para o melhor conhecimento da biodiversidade dos organismos invertebrados existentes em Portugal.

Palavras-chave: Biodiversidade, Calliphoridae, Entomologia Forense, Chaves de identificação.

Abstract

Insects are the most diverse group on planet Earth and the recycling of organic matter is one of their most underrated functions. In particular, the commonly known as blow flies (Calliphoridae) have raised the interest of the scientific community, especially in the forensic sciences field, where they can be used to provide multiple parameters related to a body, such as the Post-Mortem Interval (PMI), local of death, the presence of drugs, among other information relevant to criminal investigations.

In Portugal there are few studies related to the morphology of these species, making their identification a more difficult and time consuming task. Accordingly, the main aim of this project will be the development of an interactive key, to be made available online, with photographic records of the morphological somatic and genital characters of some of the most important species in this family, including *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) and *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758). It is expected that this tool will bring an easier and intuitive way to identify these flies, thereby contributing to a better understanding of the blowflies biodiversity found in Portugal.

Keywords: Biodiversity, Calliphoridae, Forensic Entomology, Identification keys.

⁹ Encontro sobre Biodiversidade e Conservação de Insetos em Portugal.

Póster:



Pictorial characterization of Diptera Calliphoridae. A tool for forensic studies

Bruno Dóres^{1*}, Inês Fontes^{1*}, M. Teresa Rebelo²

¹ Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
* Email: bruno_miguel.92@hotmail.com
* These authors contributed equally.



**Ciências
ULisboa**
Faculdade
de Ciências
da Universidade
de Lisboa

Insects are a major recycler of organic matter in nature. That said, the flies of the Calliphoridae family, for example, can be used to provide some forensic information such as:

- Post-Mortem Interval (PMI);
- Local of death;
- Presence of drugs;
- Existence of sexual abuse.

Since there are few studies about this family in Portugal, the main aim of this project will be the development of a pictorial key that features some of the most important species of this family, thus contributing to a better understanding of the biodiversity of these species.

FAMILY: CALLIPHORIDAE

Insects are the most diverse group of animals on the planet Earth. In particular, the blowflies are considered one of the most important families in the forensic areas, since they are the first insects to colonize a corpse. It is possible to separate this family from other families of flies by the following characteristics:

- Calyptra well developed (Fig. 1) and abdomen usually shining with metallic colors (Fig. 1 and Fig. 2);
- Presence of a row of setae in the katepimeron (Fig. 3);
- Presence of two hairs in the notopleuron (Fig. 4).







KEY IMPORTANCE

Nowadays, conventional keys are still the most used for species identification. However, this keys are not as accurate and can present some problems leading to errors in identification of species. In an attempt to solve some of these problems, it is expected to create an interactive key with photographic record of the morphological characteristics (somatic and genitalia) of the main species in the Calliphoridae family.

GENUS: CALLIPHORA

The calliphora species can be easily distinguished from other genus by the following characteristics:

- Absence of hair on the stem-vein (Fig. 5);
- Presence of hair on the lower calyptra (Fig. 6).




For example, the main species of this genus (*C. vicina* and *C. vomitoria*) can be distinguished by:

- Bucca coloring (orange - *C. vicina*, Fig. 7; black - *C. vomitoria*, Fig. 8);
- Color of the anterior spiracle (yellow - *C. vicina*, Fig. 7; brownish-black - *C. vomitoria*, Fig. 8).




WORK IN PROGRESS...

It is expected to develop a complete pictorial key that differentiates more easily the following species of the Calliphoridae family: *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia caesar*, *Lucilia eximia*, *Melinda viridicyanea* and *Pollenia rudis*.



CESAM